

Metalltranslocon - Komplexe in Chloroplasten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Roland Stübe

am

13.12.2012

Dissertation eingereicht am: 13.12.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2013

Erstgutachterin: PD Dr. Katrin Philippar

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Nickelsen

ABKÜRZUNGEN	IV
I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG: Übergangsmetalle in Pflanzen	3
II.1. Aufnahme der Übergangsmetalle am Beispiel Eisen	4
II.2. Intrazellulärer Transport und Funktion der Metalle	5
II.2.1. Eisen	5
II.2.2. Kupfer	8
II.2.3. Zink	9
II.2.4. Mangan	10
II.2.5. Molybdän	10
II.2.6. Nickel und Kobalt	11
II.3. Ziele dieser Arbeit	12
III. MATERIAL	13
III.1. Vektoren und Konstrukte	13
III.2. Oligonukleotide	14
III.3. Chemikalien	16
III.4. Enzyme	16
III.5. Molekulargewichts- und Größenstandards	16
III.6. Antiseren	17
III.7. Bakterienstämme	17
III.8. Pflanzenmaterial	17
IV. METHODEN	18
IV.1. Pflanzenphysiologische Methoden	18
IV.1.1. Saatgut und Anzuchtbedingungen	18
IV.1.2. Transiente Transformation von Protoplasten aus <i>Arabidopsis</i>	18
IV.1.3. Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
IV.1.4. Induzierbarer Proteinverlust und Protein-Überexpression	20
IV.1.5. Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
IV.2. Mikrobiologische Methoden	22
IV.2.1. Medien und Anzucht	22
IV.2.2. Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	23
IV.2.3. Split-Ubiquitin-System	24

IV.3. Molekularbiologische Methoden.....	25
IV.3.1. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....	25
IV.3.2. Klonierungsstrategien.....	25
IV.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	25
IV.3.4. Präparation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
IV.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	26
IV.3.6. PCR-Genotypisierung	26
IV.3.7. Sequenzierung von DNA	27
IV.3.8. RNA-Präparation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
IV.3.9. Reverse Transkription	27
IV.3.10. Quantitative Echtzeit-RT-PCR.....	28
IV.3.11. Affymetrix Microarray-Analyse	28
IV.4. Biochemische Methoden	29
IV.4.1. Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
IV.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	29
IV.4.3. Immunfällung	30
IV.4.4. Membransolubilisierung.....	31
IV.4.5. Proteolyse von Membranvesikeln	31
IV.4.6. Protein-"PEGylierung"	31
IV.4.7. Immunodetektion von Proteinen	32
IV.4.8. Antiseren	33
IV.4.9. Isolierung von Hüllmembranen aus <i>Arabidopsis</i> -Chloroplasten	34
IV.4.10. Isolierung von Hüllmembranen aus Erbsen-Chloroplasten	35
IV.4.11. Metallgehalt-Analyse	35
V. ERGEBNISSE	36
V.1. Das Metalltranslocon um PIC1	36
V.1.1. Identifikation von PIC1 Interaktionspartnern	36
V.1.2. Homooligomerisierung von PIC1 und Interaktion in Pflanzenzellen	39
V.1.3. Die TonB-Box-Domäne von PIC1	41
V.1.4. Die Membranorientierung von PIC1	43
V.2. NiCo-Proteine aus <i>Arabidopsis</i> und Erbse	45
V.2.1. Die NiCoT-Familie	47
V.2.2. Gewinnung von rekombinanten NiCo-Proteinen.....	49
V.2.3. Subzelluläre Lokalisation von At-NiCo1 und At-NiCo2.....	51

V.2.4. Membranintegration von NiCo	53
V.2.5. Membranorientierung von NiCo	54
V.2.6. NiCo-Expression in der Pflanze	56
V.2.7. Analyse von NiCo-Mutanten in <i>Arabidopsis</i>	59
V.2.7.1. Charakterisierung der <i>nico1-1</i> -Mutante	59
V.2.7.2. NiCo2-Mutanten in <i>Arabidopsis</i>	61
V.2.7.3. RNAi-"knock down" von At-NiCo2 im <i>nico1-1</i> -Hintergrund	63
V.2.7.4. Metallgehaltanalyse in der <i>nico1/2</i> -Doppelmutante	65
V.2.7.5. Transkriptom-Analyse der <i>nico1/2-dm</i>	67
V.2.7.6. Phänotyp der <i>nico1/2-dm</i> unter verschiedenen Lichtbedingungen	72
V.2.7.7. NiCo-Überexpressionspflanzen in <i>Arabidopsis</i>	73
V.3. Weitere Proteine mit Metalltransport-Funktion im Chloroplasten	75
V.3.1. Die Familie der YGGT-Proteine	75
V.3.2. Subzelluläre Lokalisation der YGGT-Proteine	76
V.4. Die CBY-Proteinfamilie	79
V.4.1. Gewinnung der rekombinanten Proteine NAP13 und NAP14	79
V.4.2. Subzelluläre Lokalisation von NAP13 und NAP14	81
V.4.3. Membranassoziation von NAP13 und NAP14	82
V.4.4. Nachweis einer Interaktion von CBY und NAP13	83
VI. DISKUSSION: Metalltranslocon-Komplexe in Chloroplasten	85
VI.1. Molekulare Interaktionen - PIC1, NiCo und YGGT	86
VI.1.1. NiCo-Proteine	87
VI.1.2. YGGT-Proteine	91
VI.2. Funktionelle Analysen	93
VI.3. Funktion in der Pflanze	95
VI.3.1. NiCo-Proteine	95
VI.4. Molekulare Interaktionen - CBY, NAP13 und NAP14	100
VII. LITERATUR	103
VIII. ANHANG	114

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: "bovine serum albumin")
cDNA	Komplementäre (copy-) DNA
Col-0	Ecotyp Columbia-0
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cTP	Chloroplastidäres Transitpeptid
DMP	Dimethyl pimelimidate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Verstärkte Chemielumineszenz; engl.: "enhanced chemiluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCH	Faktor Expressionsregulation (engl.: "fold change")
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl: "green fluorescent protein")
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
His	Histidin
Hyg	Hygromycin
IE	Innere Chloroplasten-Hüllmembran (engl.: "inner envelope")
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB	Medium; engl.: "lysogeny broth"

Lys	Lysin
M	Molar
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Murashige-Skooge Salz
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
OE	äußere Chloroplasten-Hüllmembran (engl.: "outer envelope")
OEP	Protein der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran (engl.: "outer envelope protein")
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (engl.: "polymerase chain reaction")
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ps	<i>Pisum sativum</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rE	Relative Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: "rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR auf revers-transkribierter RNA
SA	Standardabweichung
SC	Medium; engl.: "synthetic complete"
SD	Medium; engl.: "synthetic defined"
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl.: "sodium dodecyl sulfate")
Sec	Sekunde
SigD	Signaldifferenz
Tab.	Tabelle
T-DNA	Transfer-DNA
TIC	Translocon an der inneren Chloroplasten-Hüllmembran
TMD	Transmembran-Domäne

Tricine	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Tween	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat
UTR	Untranslatierter Bereich (engl.: "untranslated region")
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

I. ZUSAMMENFASSUNG

Der Transport von Übergangsmetallen wie Eisen, Kupfer, Zink oder Mangan in die Organellen der Pflanzenzelle ist für deren Lebenszyklus essentiell. Eisen, als das abundanteste Übergangsmetall in der pflanzlichen Zelle, ist ein wichtiger Bestandteil von vielen Proteinen und Kofaktoren und spielt aufgrund seiner Redoxeigenschaften eine entscheidende Rolle im Elektronentransport der Photosynthese. Eine Störung der Metallhomöostase hat somit meist dramatische Folgen für den Entwicklungszyklus der Pflanze. Dies unterstreicht die Bedeutung aller beteiligten Proteine in den Transport- sowie Regulationsmechanismen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein NiCo als Interaktionspartner der Eisenpermease PIC1 und somit als ein Bestandteil eines Metalltranslocons in Chloroplasten identifiziert. Durch Immunoblotanalysen sowie *in vivo* Lokalisationsstudien konnten die zwei homologen NiCo-Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 aus *Arabidopsis* sowie das Protein Ps-NiCo aus Erbse in der inneren chloroplastidären Hüllmembran lokalisiert werden. Orthologe Proteine der NiCoT-Familie wurden in photosynthetisch aktiven Organismen, allerdings aber auch in nicht photosynthetisch aktiven Organismen gefunden. Somit kann eine Funktion von NiCo ausschließlich im Zusammenhang mit der Photosynthese ausgeschlossen werden. Ein direkter Nachweis einer Metalltransportfunktion konnte, im Gegensatz zu einigen homologen NiCoT-Proteinen aus Bakterien, nicht erbracht werden. Eine konservierte Domäne, für die in den bakteriellen NiCoT-Proteinen eine Nickelbindefunktion nachgewiesen wurde, auch in den NiCo-Proteinen aus *Arabidopsis* sowie aus Erbse in leicht veränderter Form identifiziert werden. Eine Funktion als metallbindendes oder sensorisches Protein in dem chloroplastidären Metalltranslocon ist somit wahrscheinlich, muss allerdings noch weiter untersucht werden. Dass die NiCo-Proteine eine essentielle Funktion ausfüllen, zeigte die Analyse von NiCo1/2-Verlustmutanten (*nico1/2-dm*) in *Arabidopsis*. Ein "knock down" von *At-NiCo2* in einem *nico1-1*-"knock out"-Hintergrund führte zu einem Entwicklungsstopp der Pflanze bis hin zu einem stark chlorotischen Keimling. Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von Dauer- bzw. Niedriglicht-Bedingungen auf die Ausprägung der Chlorosen ließ die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Ursache vermuten. Die Analyse der Regulation der Genexpression in der *nico1/2-dm*, welche auf eine Antwort der Pflanze auf oxidativen Stress hindeutet, unterstützte diese Vermutung. Die Bildung von ROS ist ein weiterer Hinweis auf eine gestörte Metallhomöostase. Da eine direkte Beeinflussung des Metallgehalts in der Pflanze nicht festgestellt werden konnte, wird eine Delokalisation

innerhalb der Zelle vermutet. Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Ergebnissen eine höchstwahrscheinliche Funktion von NiCo als metallbindendes, sensorisches Protein im chloroplastidären Metalltransport. Außer in dem Hefe-Split-Ubiquitin-System konnte in keinem der durchgeführten Ansätze eine direkte Interaktion von NiCo und PIC1 gezeigt werden. Durch Immunfällungen gegen NiCo sowie gegen PIC1 wurde die Vermutung eines fehlenden Linkerproteins bestätigt. Analog zu vorhergesagten prokaryotischen Nickel/Kobalt-ABC-Transportersystemen, konnte mit dem Protein YGGT die möglicherweise dritte Komponente eines PIC1-NiCo-YGGT-Proteinkomplexes identifiziert und die Lokalisation dieses Proteins ebenso in der inneren chloroplastidären Hüllmembran bestimmt werden. Die Bestätigung der Zusammengehörigkeit aller drei Proteine und deren Interaktion ist somit zukünftig eine wichtige Aufgabe. Auch der Interaktionsmechanismus ist bisher nur seitens PIC1 untersucht. In dem Hefe-Split-Ubiquitin-System konnte die TonB-Box-Domäne von PIC1 als essentiell und notwendig für die Interaktion bestätigt werden. Der Mechanismus des Metalltransports durch PIC1 weist somit eine Ähnlichkeit zu dem Eisen-Zitrat-Transporter FecA aus *E. coli* auf.

Eine Anfangs vermutete Interaktion der löslichen und im Chloroplasten lokalisierten ABC-Transporter-Untereinheiten NAP13 und/oder NAP14 mit PIC1 konnte nicht bestätigt werden. In einer Immunfällungen gegen NAP13 wurde allerdings das membranständige Protein CBY als möglicher Interaktionspartner identifiziert. Die Lokalisation von CBY in der inneren chloroplastidären Hüllmembran konnte, ebenso wie die Interaktion mit NAP13, *in vivo* bestätigt werden. NAP13 und CBY könnten somit einen weiteren Proteinkomplex mit Funktion im chloroplastidären Metalltransport darstellen. Hierzu sind allerdings in Zukunft noch weitere Untersuchungen der Interaktion, der Funktion des möglichen Komplexes sowie weitere Analyse von pflanzlichen Mutantenlinien notwendig.

II. EINLEITUNG: Übergangsmetalle in Pflanzen

Ein Pflanze benötigt für ihren kompletten Lebenszyklus 17 der bekannten Elemente. Diese sind für alle Pflanzen als essentiell beschrieben und werden in zwei Gruppen eingeteilt: Die Makro- und die Mikronährstoffe (Marschner, 1995). Die Gruppe der Makronährstoffe umfasst die Elemente Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Sauerstoff (O), Calcium (Ca), Kalium (K), Magnesium (Mg), Stickstoff (N), Schwefel (S) und Phosphor (P), wobei C, H und O ca. 95% des Trockengewichts der Pflanze ausmachen. Die Elemente Chlor (Cl), Bor (B), Kupfer (Cu), Eisen (Fe), Mangan (Mn), Molybdän (Mo), Nickel (Ni) sowie Zink (Zn) bilden die Gruppe der Mikronährstoffe, welche typischerweise unter einem Anteil von 100µg pro g Trockengewicht vorkommen (Pilon-Smits *et al.*, 2009).

Tabelle 1: Übergangsmetalle in Pflanzen

Pflanzliche Übergangsmetalle mit Oxidationsstadien bei der Aufnahme in die Pflanze und biologisch relevanten Stufen sowie der Konzentrationsgehalt in der Pflanze sind angegeben. (Palmer und Guerinot, 2009; Hänsch und Mendel, 2009).

Metall	Aufnahme in die Pflanze	biologisch relevante Oxidationsstadien	Konzentration in der Pflanze [µg g ⁻¹ Trockengewicht]
Eisen	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	50-150
Mangan	Mn ²⁺	Mn ²⁺ , Mn ³⁺ , Mn ⁴⁺	10-100
Zink	Zn ²⁺	Zn ²⁺	15-50
Nickel	Ni ⁺	Ni ²⁺	15-22
Kupfer	Cu ²⁺	Cu ⁺ , Cu ²⁺	1-20
Kobalt	Co ²⁺	Co ⁺ , Co ²⁺	0,2-1
Molybdän	MoO ₄ ²⁻	Mo ⁴⁺ , Mo ⁶⁺	0,1-1

Obwohl Übergangsmetalle nur in geringen Mengen benötigt werden (siehe Tabelle 1), sind die Auswirkungen für die Pflanze und deren Entwicklung fatal, sollte die Metallversorgung gestört werden. Aus diesem Grund ist es für den vollständigen Entwicklungszyklus der Pflanze wichtig, den Metallgehalt zu regulieren. Zu diesem Zweck hat sich im Pflanzenreich ein komplexes Netzwerk der Metallhomöostase entwickelt, welches die Mobilisierung, die Aufnahme, die Kompartimentierung in der Pflanze, die intrazelluläre Verteilung sowie die Speicherung von Metallen einschließt (zur Übersicht siehe: Palmer und Guerinot, 2009; Hänsch und Mendel, 2009; Conte und Walker, 2011; Kobayashi und Nishizawa, 2012). Dieses Netzwerk zu verstehen, dessen Komponenten zu identifizieren und die komplexen Regulationsmechanismen zu entschlüsseln, ist ein weitläufiges und wichtiges Ziel der aktuellen und zukünftigen Forschung. Im Hinblick auf die sich ändernden Klima- und Umweltbedingungen sowie der wachsenden Weltbevölkerung, steigt die Notwendigkeit

immer mehr Fläche für den Anbau von Nutzpflanzen erschließen zu müssen. Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet werden einen wichtigen Anteil dazu beitragen, die Anzucht von Nutzpflanzen anzupassen und vorhandene Anbaufläche effektiver nutzen zu können. Jeder Teil des Metallhomöostase-Netzwerks ist für sich ein komplexes Thema. In den letzten Jahren wurden wichtige Fortschritte in deren Erforschung erzielt, aber viele Aspekte sind weiterhin ungeklärt. Im Folgenden wird der aktuelle Stand der Forschung zum Transport und der intrazellulären Verteilung von Metallen in der Pflanzenzelle beschrieben. Sofern nicht explizit erwähnt, wurden alle erläuterten Forschungsergebnisse in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* erzielt.

II.1. Aufnahme der Übergangsmetalle am Beispiel Eisen

Die Hauptquelle der Metalle ist der Boden, wo diese meist in gebundener, unlöslicher und somit für die Pflanze in nicht verfügbarer Form vorliegen. In alkalischen Böden, welche ca. 30% aller Agrarflächen der Welt ausmachen, wird diese Unlöslichkeit weiter verstärkt. Um die Mobilisierung der Metalle trotzdem zu bewerkstelligen, haben sich im Pflanzenreich effektive Strategien für die Aufnahme dieser entwickelt.

Alle höheren Landpflanzen, mit Ausnahme der Gräser, verwenden zur Metallaufnahme die so genannte Strategie I (Römheld und Marschner, 1986). Dabei wird als erstes der Boden durch die Abgabe von Protonen in die Rhizosphäre angesäuert. Die Erniedrigung des pH-Werts erhöht die Löslichkeit der in Hydroxiden und Oxiden gebundenen Fe^{3+} -Ionen. Für den Protonentransport aus Wurzelzellen in den Boden sind ATPasen der AHA-Familie (*Arabidopsis* H^+ -ATPase) verantwortlich, welche bei Eisenmangel stärker exprimiert werden (Palmgren, 2001; Dinneny *et al.*, 2008). Einige Aufnahmetransporter sind spezifisch bzw. haben eine höhere Affinität für Metalle mit einem bestimmten Oxidationsstatus. Die hochaffinen Transporter IRT1 (engl.: "iron regulated transporter 1") und COPT1 (engl.: "copper transporter 1"), als Beispiel genannt, nehmen Eisen bzw. Kupfer als zweiwertige Ionen auf (Puig *et al.*, 2007). Somit müssen diese Metalle zunächst reduziert werden, da sie im Boden mit dem Oxidationsstatus +III komplexiert sind. Für die Reduktion von Eisen (Fe^{III} zu Fe^{II}) ist das in den Epidermiszellen der Wurzel lokalisierte Protein FRO2 (engl.: "ferric chelate reductase 2"; Robinson *et al.*, 1999) zuständig. Während die Aufnahme von Eisen in die Wurzel durch IRT1 (Eide *et al.*, 1996; Varotto *et al.*, 2002; Vert *et al.*, 2002b) und von Kupfer durch COPT1 (Sancenon *et al.*, 2004) gut erforscht ist, erfolgt die Aufnahme anderer Metalle entweder auch durch die vorher genannten Transporterklassen oder durch bisher nicht entdeckte Proteine.

Die zweite Strategie basiert auf der Chelatierung der Metalle und ist vorzugsweise bei Gräsern, zu denen einige der wichtigsten Nutzpflanzen wie z.B. Mais (*Zea mays*) oder Reis (*Oryza sativa*) gehören, zu finden. Diese scheiden Phytosiderophore (MAs; engl.: "mugineic acid") aus, welche dann dreiwertige Metallionen chelatieren. Für die Sekretion der MAs ist TOM1 (engl.: "transporter of MAs 1") identifiziert worden (Nozoye *et al.*, 2011). Die Metall-Phytosiderophor-Komplexe werden daraufhin wieder in die Wurzel aufgenommen. Das Protein YS1 (engl.: "yellow stripe 1") wurde als Transporter für Eisen-Phytosiderophor-Komplexe in die Wurzel als erstes in Mais entdeckt (Curie *et al.*, 2001). Folgend wurden homologe Proteine in verschiedenen anderen Gräsern z.B. Gerste (HvYS1; Murata *et al.*, 2006) oder Reis (OsYSL15; Inoue *et al.*, 2009) beschrieben.

Der Transport der Metalle von der Wurzel über den Stengel in das Blatt bis hin zu den Organellen, wird von vielen weiteren Proteinen und Regulationsmechanismen gesteuert (zur Übersicht siehe: Hall und Williams, 2003; Morrissey und Guerinot, 2009, Conte und Walker, 2011; Kobayashi und Nishizawa, 2012).

II.2. Intrazellulärer Transport und Funktion der Metalle

Im Fokus vieler Forschungsprojekte liegt die intrazelluläre Verteilung von Metallen. Diese umfasst den Transport der Metalle in die Zellorganellen Chloroplast, Mitochondrium und Vakuole. Um einen regulierten Transport in bzw. aus den verschiedenen Organellen einer Zelle zu bewerkstelligen, gibt es metall- sowie organellenspezifische Transportsysteme (zur Übersicht siehe: Conte und Walker, 2011; Nouet *et al.*, 2011). Metalle erfüllen in den jeweiligen Organellen oftmals unterschiedliche, für die Pflanze meist essentielle Funktionen. Somit ist die Regulation der Metallhomöostase und des Transports, sowie der für den Metalltransport zuständigen Proteinkomplexe unter den verschiedensten Lebensbedingungen für die Pflanze wichtig.

II.2.1. Eisen

Eisen stellt das häufigste Übergangsmetall in der Pflanze dar. 80-90% des Eisens einer Pflanzenzelle aus maturen Blättern befindet sich im Chloroplasten. Der Eisentransport über die äußere Hüllmembran ist bisher unbekannt. Für die Aufnahme über die innere Hüllmembran wird Eisen von FRO7 (engl.: "chloroplast Fe(III) chelate reductase") zu Fe^{2+} reduziert (Jeong *et al.*, 2008) und aktiv transportiert (Shingles *et al.*, 2002). In diesen Transport ist das Protein PIC1 (engl.: "permease in chloroplast 1") involviert (Abbildung 1).

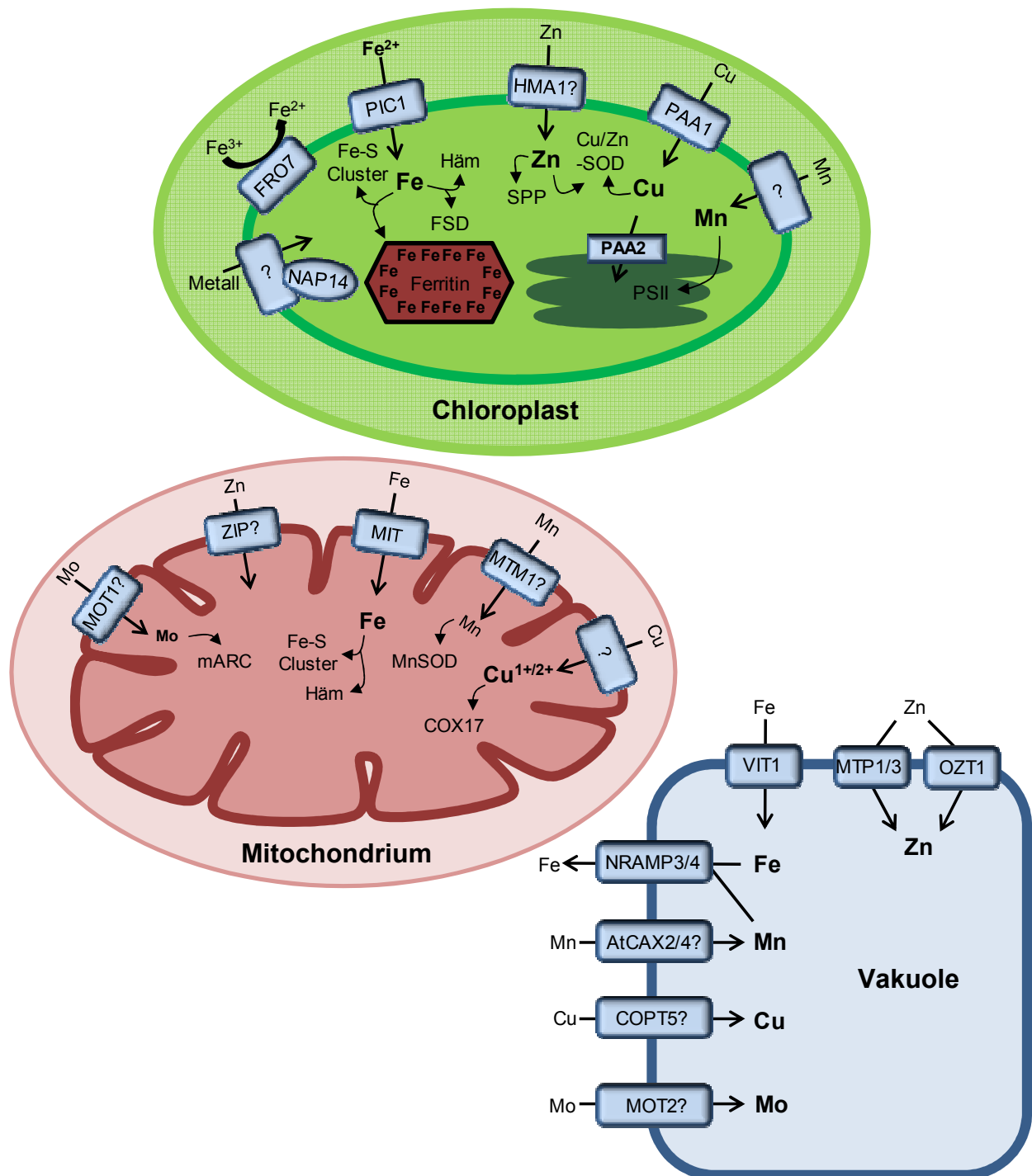


Abbildung 1: Metallhomöostase und Transport in Organellen

Die im Text beschriebenen Metalltransporter sind als blaue Boxen zusammen mit ihren möglichen Substraten Eisen (Fe), Zink (Zn), Kupfer (Cu), Mangan (Mn), Nickel (Ni), Molybdän (Mo) oder Kobalt (Co) dargestellt und die Transportrichtung ist durch schwarze Pfeile angegeben. Fragezeichen zeigen noch unbekannte Transporter auf. Die Schriftgröße der Metalle in den Organellen gibt ihre relative Menge zueinander an. Zudem sind einige wichtige metallabhängige Proteine und Metall-Kofaktoren (Beschreibung im Text) in der Nähe des jeweiligen Metalls abgebildet.

pic1-"-knock out"-Mutanten zeigen einen extrem chlorotischen Phänotyp und weisen eine defekte Chloroplasten-Biogenese auf (Duy *et al.*, 2007b). Die Störung der Entwicklung des Thylakoidsystems, sowie die Akkumulation des Eisenspeicherprotein Ferritin sind weitere Indizien für eine Funktion von PIC1 im Eisentransport. Einen direkten funktionellen Nachweis erbrachte die Wachstumskomplementation des in der Eisenaufnahme gestörten Hefestamms *fet3fet4* durch PIC1. Zudem konnte in PIC1-Überexpressionspflanzen eine erhöhte Eisenkonzentration in den Chloroplasten gemessen werden. (Duy *et al.*, 2007b; Duy *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu den PIC1-"knock out"-Pflanzen (Ferritin Akkumulation) weisen PIC1-Überexpressionslinien einen Ferritin-"knock out" ähnlichen Phänotyp auf, der durch Chlorosen und eine defekte Blüten/Samenentwicklung und verminderte Fertilität gekennzeichnet ist.

Die Funktionen von Eisen im Chloroplasten sind vielfältig. Es wird für die Synthese von Chlorophyll benötigt und ist Bestandteil von Eisen-Schwefel-Cluster sowie Häm-Proteinen (Kim und Guerinot, 2007). Eisen-Schwefel-Cluster haben z.B. Funktionen im Elektronentransfer, in der Substratbindung von Enzymen oder in der Stabilisierung von Proteinstrukturen. Die am besten bekannten Häm-Proteine sind die photosynthetischen und respiratorischen Cytochrome. Somit spielt Eisen eine ganz essentielle Rolle bei dem photosynthetischen Elektronentransfer. Weitere bekannte Häm-Proteine sind die oxidativen Enzyme Katalase, Peroxidase und NADPH-Oxidase (Palmer und Guerinot, 2009). Die FSD Superoxid-Dismutasen (engl.: "Fe superoxid dismutase"), welche den Chloroplasten vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl.: "reactive oxygen species") schützen, benötigen Eisen als Cofaktoren (Myouga *et al.*, 2008). Das bekannteste Protein, welches im Stroma von Chloroplasten freies Eisen direkt bindet, ist das Ferritin. Freie Eisenionen sind sehr reaktiv und somit toxisch für die Pflanze. Über die Fenton-Reaktion können diese die Bildung von freien, reaktiven Hydroxyl-Radikalen (ROS) aus H₂O₂ katalysieren. Ferritin reguliert die chloroplastidäre Eisenhomöostase und schützt somit vor oxidativem Stress (Ravet *et al.*, 2009). Ein weiteres Protein, welches ein Teil eines chloroplastidären Metalltransporters darstellen könnte, ist NAP14. Shimoni-Shor und Mitarbeiter konnten 2010 eine signifikante Beeinflussungen der Metallhomöostase in NAP14-Knockout-Mutanten feststellen. Diese Beeinflussung zeigte sich z.B. durch einen stark chlorotischen Phänotyp, eine Erhöhung der Eisenkonzentration im Pflanzenspross, sowie eine Regulation von mit der Metallhomöostase verknüpften Genen (Shimoni-Shor *et al.*, 2010).

Auch in den Mitochondrien erfüllt Eisen wichtige Funktionen und es wurden viele Eisenabhängige Proteine identifiziert (Herald *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2010). Eisen ist, wie

schon in den Chloroplasten, auch in den Mitochondrien ein Bestandteil von Eisen-Schwefel- sowie Häm-Proteinen, welche unter anderem in dem respiratorischen Elektronentransport, speziell in den Komplexen I und II, benötigt werden. Zudem sind die Mitochondrien der Syntheseort der zellulären Eisen-Schwefel-Kluster. Nur Chloroplasten synthetisieren diese selbst. Ein pflanzlicher, mitochondrieller Eisentransporter MIT (engl.: "mitochondrial iron transporter") wurde von Bashir und Mitarbeitern 2011 in Reis identifiziert. MIT gehört zu der MSC-Protein-Familie (engl.: "mitochondrial solute carrier"). Die Eisenkonzentration in Mitochondrien aus heterozygoten *mit*-"knock-down"-Linien war, gegenüber der Eisenkonzentration in Mitochondrien aus Wildtyp-Pflanzen, drastisch reduziert. Zudem konnte MIT eine Wachstumskomplementation von den *Amrs3Amrs4*-Hefemutanten, welche eine gestörte Eisenaufnahme in die Mitochondrien haben, bewirken (Bashir *et al.*, 2011a; Bashir *et al.*, 2011b).

Für den Transport in die Vakuole wurde das Protein VIT1 (engl.: "vacular membrane transporter") beschrieben (Kim *et al.*, 2006). Eisen wird vorzugweise in der Vakuole von Samen gespeichert, wo es als Eisenquelle in der Entwicklung des Embryos dient, solange dieser noch kein Eisen aus dem Boden aufnehmen kann. Für die Remobilisierung aus der Vakuole während der Embryonenentwicklung wurden die Proteine NRAMP3 und NRAMP4 (engl.: "natural resistant-associated macrophage protein") identifiziert. Bei der Keimung von *Arabidopsis* unter Eisenmangel zeigt sich die Expression beider Proteine erhöht und eine *nramp3/nramp4*-Doppelmutante ist embryoletal (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005).

II.2.2. Kupfer

Kupfer wird über die innere Hüllmembran von *Arabidopsis*-Chloroplasten von dem Protein PAA1 (HMA6), aus der Familie der Cu^+ -transportierenden $\text{P}_{1\text{B}}$ -Typ-ATPasen, transportiert. PAA2 (HMA8), ein weiteres Protein dieser Familie, ist in den Thylakoidmembranen lokalisiert (Shikanai *et al.*, 2003; Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Eine *paal/paa2*-Doppelmutante zeigt allerdings, dass der Kupfertransport nicht vollständig blockiert ist. Somit könnten auch weitere Proteine, z.B. HMA1, in diesen involviert sein (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008). Ähnlich wie bei Eisen ist die Funktion von Kupfer im Chloroplasten sehr vielfältig. Mehr als 50% des Kupferpools einer Zelle ist im Chloroplasten angesiedelt und mit Elektronen übertragenden Proteinen wie Plastocyanin verbunden (Pilon *et al.*, 2006). Interessanterweise werden unter Eisenmangelbedingungen Proteine die Eisen benötigen durch kupferhaltige Proteine ersetzt, welche die selbe Funktion übernehmen (Merchant *et al.*, 2006). Dieser "Kupfer gegen Eisen"-Prozess wird durch Cu/Fe-regulierte microRNAs gesteuert

(Yamasaki *et al.*, 2007). Als ein Beispiel kann hier der Austausch der Cu/Zn-SOD (SOD1; Superoxid Dismutase) gegen FSD2 aufgeführt werden (Hänsch und Mendel, 2009).

Über den Kupfertransport in die Mitochondrien sowie in die Vakuole von Pflanzen ist noch nicht viel bekannt. In der Vakuole wurde bisher nur COPT5 als möglicher Übergangmetall-Transporter identifiziert (Whiteman *et al.*, 2008). In den Mitochondrien spielt Kupfer funktionell eine wichtige Rolle. Es kann als Cu^I sowie Cu^{II} vorkommen und ist daher ein wichtiges Reduktions- sowie Oxidationsagenz. Aus diesem Grund nimmt Kupfer eine bedeutende Funktion in der mitochondriellen Atmungskette ein, z.B. als Bestandteil der Cytochrom-c-Oxidase (COX). Zum Schutz der Mitochondrien vor reaktivem Kupfer wird dieses durch das Kupfer-Chaperon COX17 gebunden und dann gezielt an Proteine weitergegeben (Maxfield *et al.*, 2004).

II.2.3. Zink

Auch bei Zink ist der Transportmechanismus in alle drei Organellen noch nicht endgültig geklärt. Für den Transport in den Chloroplasten könnte, wie auch bei Kupfer, das Protein HMA1 eine Rolle spielen. Bei erhöhten Zinkkonzentrationen im Medium zeigt HMA1 eine gesteigerte ATPase-Aktivität sowie eine Vermittlung von Zinkresistenz bei dessen Überexpression (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Beim mitochondriellen Transport wird vermutet, dass wie in Hefe gezeigt wurde, Proteine der ZIP-Familie beteiligt sind (Blaby-Haas und Merchant, 2012). Für den Import in die Vakuole, welche als Zinkspeicher und somit zugleich als Schutz vor freien Zink-Ionen in der Zelle dient (Arrivault *et al.*, 2006), wurde in Reis das durch Zn²⁺ induzierte Protein OZT1 (engl.: "*Orzya sativa* Zn transporter 1") der CDF-Proteinfamilie beschrieben (Lan *et al.*, 2012). Belegt wird die Zink-Transportfunktion von OZT1 durch heterologe Expression in Hefe, welche dieser eine Toleranz gegen hohe Zinkkonzentrationen vermittelt. Des weiteren sind zwei Proteine der MTP-Familie, AtMTP1 und AtMTP3 als vakuoläre Zinktransporter beschrieben. Die Überexpression beider Proteine führt zu erhöhter Zinktoleranz, während eine Doppelmutante anfälliger gegen hohe Zinkkonzentrationen ist (Kobae *et al.*, 2004; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005; Arrivault *et al.*, 2006). Generell ist auch Zink in den Organellen ein nicht ersetzbares Metall und Zinkmangel führt zu drastischen Symptomen wie reduzierte Biomasse, chlorotische Blätter, schlechte Fertilität der Blüten und verfrühtes Absterben der älteren Blätter (Hussain *et al.*, 2004). Für mehr als 1200 Proteine der Pflanzenzelle ist die Bindung oder der Transport von Zink vorhergesagt. Dazu gehören Zink-Finger enthaltende Proteine, Transkriptionsfaktoren, Oxidoreduktasen oder hydrolytische Enzyme wie die Metalloproteasen (Krämer und Clemens, 2005). Im

Chloroplasten ist, neben der schon bei Kupfer aufgeführten Cu/Zn-SOD, die prozessierende Peptidase (SPP, engl.: "stromal processing peptidase") im Stroma eines von vielen Beispielen eines zinkabhängigen Enzyms (Richter und Lamppa, 2003). Auch die Reparatur des Photosystems II wird durch das zinkabhängige Enzym D1 durchgeführt (Bailey *et al.*, 2002). In Mitochondrien ist Zink als zentrales Metallatom, z.B. bei der Carbonanhydrase der benötigte Cofaktor. Interessanterweise wird Zink in der Zelle nie in seinem Redoxstatus von +II geändert und kann somit nicht direkt am Elektronentransfer beteiligt sein (zur Übersicht siehe: Sinclair und Kramer, 2012).

II.2.4. Mangan

Für den Transport in die Mitochondrien wurde in Hefe das Protein MTM1 (engl.: "manganese trafficking factor for mitochondrial SOD2") beschrieben. Das homologe *Arabidopsis*-Protein AtMTM1 könnte somit ein möglicher Kandidat für den mitochondriellen Transport sein (Su *et al.*, 2007). Für den Manganimport in die Vakuole wurden die zwei $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter AtCAX2 und AtCAX4 (engl.: "calcium exchanger 2/4") identifiziert (Hirschi *et al.*, 2000, Pittman, 2005). Auch AtVIT1 könnte hier ein Kandidat sein. Eine Überexpression von AtVIT1 hat einen Anstieg des Mangangehalts in der Vakuole zur Folge (Kim *et al.*, 2006). Für die Remobilisierung von Mangan aus der Vakuole sind, wie bei Eisen, AtNRAMP3 und AtNRAMP4 beschrieben (Lanquar *et al.*, 2010).

Funktionell ist Mangan der Aktivator der Superoxid Dismutase MnSOD in den Mitochondrien und somit in den Schutz gegen ROS verwickelt (Pilon *et al.*, 2009). In Chloroplasten ist Mangan ein wichtiges Metall des katalytischen Zentrums des sauerstoffproduzierenden Komplexes (OEC; engl.: "oxygen evolving complex"; Merchant und Sawaya, 2005) des Photosystems II (PSII). Die PSII Untereinheiten D1 sowie CP43 besitzen einen für ihre Funktion essentiellen Mn_4Ca -Komplex (Umena *et al.*, 2011). Manganmangel führt somit zu Photoinhibierung des PSII und folglich auch zur Bildung von ROS. Zwei weitere, sehr wichtige Mangan-abhängige Enzyme sind die in den Peroxysomen lokalisierte Isozitat-Lyase (Khan *et al.*, 1992) sowie die im Cytosol befindliche PEP-Carboxylase (Holyoak *et al.*, 2006; zur Übersicht siehe Puig und Penarrubia, 2009).

II.2.5. Molybdän

Für das Protein MOT1, ein möglicher mitochondrieller Molybdäntransporter, wurde eine hochspezifische Molybdänbindung nachgewiesen (Tejada-Jimenez *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008). Die Lokalisation in der Mitochondrien-Hüllmembran (Baxter *et al.*, 2008) oder im

endomembranen System (Tejada-Jimenez *et al.*, 2007) ist allerdings noch nicht geklärt. Ein Protein für den Molybdäntransport in die Vakuole, welche auch für dieses Übergangsmetall einen wichtigen Speicherort darstellt, könnte das im Tonoplast der Vakuole lokalisierte MOT2 sein (Gasber *et al.*, 2011). Chloroplasten lokalisierte Molybdäntransporter sind bisher nicht bekannt.

Die einzige Form in der Molybdän für Pflanzen verfügbar ist, ist das Molybdat-Anion MoO_4^{2-} . Wie bei allen anderen Übergangsmetallen wurden auch bei zu hohen Molybdänkonzentrationen Symptome beobachtet, die auf toxische Eigenschaften hinweisen (Turnlund, 2002). Zudem führt Molybdänmangel zu einem embryonalen Phänotyp. Mangel- sowie Stresssymptome deuten auf eine essentielle Bedeutung des Übergangsmetalls hin. Molybdän wurde als ein Bestandteil von bisher fünf bekannten pflanzlichen Metalloenzymen identifiziert. Diese sind die im Cytosol lokalisierte Nitrat-Reduktase und die Aldehyd-Oxidase, sowie die Sulfit-Reduktase und Xanthin-Dehydrogenase in den Peroxisomen und die mitochondrielle Amidoxim-Reduktase (mARC; Mendel und Kruse, 2012). In diesen Enzymen bildet Molybdän, mit Pterin komplexiert, den Molybdän-Cofaktor (Moco) als aktives Zentrum (Mendel, 2011; zur Übersicht siehe: Mendel und Kruse, 2012).

II.2.6. Nickel und Kobalt

In Prokaryoten sind die Proteine der NiCoT-Familie für den Transport von Nickel und Kobalt beschrieben (Eitinger *et al.*, 2005). Alle Proteine dieser Familie besitzen ein stark konserviertes $\text{Ni}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ -Bindemotiv (Eitinger *et al.*, 1997). Für NixA aus *Helicobacter pylori* (Fulkerson und Mobley, 2000), RcnA aus *E. coli* (Iwig *et al.*, 2006) sowie Nic1p aus *Schizosaccharomyces pombe* (Eitinger *et al.*, 2000) wurde der Ni^{2+} -Transport bzw. die Beteiligung daran direkt nachgewiesen. Auch in Pflanzen gibt es Verwandte der NiCoT-Familie, deren Untersuchung allerdings noch nicht weit fortgeschritten ist. Ein NiCoT-Protein aus Reis wurde, auf Grund einer streifenartigen Nekrose bei Blättern der Mutante, als Zebra-Nekrose-Protein beschrieben und in den Chloroplasten lokalisiert (Li *et al.*, 2010). Hinweise auf Nickel/Kobalt-Transporter in Mitochondrien sowie der Vakuole wurden bisher noch nicht gefunden. Allerdings gibt es Kobalt- (Baker *et al.*, 2000) sowie Nickel-hyperakkumulierende (Krämer *et al.*, 1997) Pflanzen, welche diese Metalle in bis zu 1000facher Konzentration in ihren Blättern aufweisen. Dies deutet auf einen regulierbaren Kobalt- und Nickeltransport in der Pflanze hin.

Nickel ist in zu hohen Konzentrationen toxisch und führt zur Hemmung von Wachstum, Photosynthese und Samenkeimung sowie zur Ausprägung von Chlorosen und Nekrosen

(Ashraf *et al.*, 2011; Dubey und Pandey, 2011). Das wohl wichtigste, nickelabhängige Enzym in Pflanzen ist die Urease. Urease ist das allererste Enzym welches kristallisiert und bei dem Nickel als zentrales Metall nachgewiesen wurde. Die Urease katalysiert die Hydrolyse von für die Pflanze schädlichem Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid und spielt somit auch eine wichtige Rolle im Stickstoffhaushalt der Pflanze (Carter *et al.*, 2009).

Mit einer Konzentration von 0,2-1 µg pro g Trockengewicht gehört Kobalt schon nicht mehr zu den Übergangsmetallen, sondern zu den sogenannten "beneficial Elements" (Pilon-Smits *et al.*, 2009). In zu hohen Konzentrationen ist auch Kobalt toxisch für Pflanzen. Allerdings werden auch positive Effekte wie z.B. verstärktes Wachstum oder erhöhte Samenproduktion und Keimung bei Erbsenpflanzen durch geringe Mengen Kobalt im Dünger beschrieben (Pilon-Smits *et al.*, 2009). Über pflanzliche, kobaltabhängige Enzyme ist allerdings nicht viel bekannt. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass Kobalt in der Inhibierung des Ethylen-Rezeptors eine Rolle spielt und somit eine Funktion in der Blattalterung hat (Palit *et al.*, 1994). In Prokaryoten hingegen ist es ein wichtiger Cofaktor in Vitamin B12.

II.3. Ziele dieser Arbeit

Metalltransport und Homöostase stellen einen wichtigen Aspekt im Lebenszyklus der Pflanze dar. Für den Metalltransport über die chloroplastidären Hüllmembranen sind die beteiligten Proteine noch weitestgehend unerforscht sowie der genaue Mechanismus ungeklärt. Die Entdeckung und Beschreibung des in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisierten Proteins PIC1 und seine Funktion bei der Eisenaufnahme (Duy *et al.*, 2007b, Duy *et al.*, 2011), stellt daher eine gute Grundlage und Ausgangspunkt für die weitergehende Forschung dar. Es wird davon ausgegangen, dass PIC1 das erste eines mehrere Proteine umfassenden Metalltranslocons in Chloroplasten darstellt. Aufbauend auf die im Vorfeld gewonnen Erkenntnisse, sollten daher mit PIC1 interagierende Proteine identifiziert werden. Hierzu sollten sowohl *in vitro* und *in vivo* Analysen herangezogen werden. Weiterführendes Ziel war es, diese Interaktionspartner zu charakterisieren und deren Funktion in Metalltransport und Homöostase der Pflanze zu untersuchen. Ein zweiter Fokus der Arbeit lag auf der Identifikation und Beschreibung von weiteren möglichen Metall-transportierenden ABC-Transporterkomplexen in Chloroplasten.

III. MATERIAL

III.1. Vektoren und Konstrukte

Für die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden folgende Plasmid-Vektoren verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Plasmid-Vektoren

Plasmid-Vektor	Verwendung	Herkunft
pBT3-SUC pPR3-N pAL-Alg5 pDL2-Alg5	Split-Ubiquitin-System (DUALmembrane kit 3)	DUALsystems Biotech (Zürich, Schweiz)
pJET1.2 pCRblunt	Subklonierung Subklonierung	Fermentas (St.Leon-Rot) Invitrogen (Karlsruhe)
pPROex pet21d	Bakterielle Expression Bakterielle Expression	Invitrogen (Karlsruhe) Novagene/Merck (Darmstadt)
p2GWF7 pK7FWG2 pB7YWG2 pB7CWG2	C-Terminal GFP C-Terminal GFP, binär C-Terminal YFP, binär C-Terminal CFP, binär	Plant Systems Biology (University of Gent, Belgien)
pOpON2 pOpOFF2K pOpOFF2H	pfl. Überexpression, induzierbar pfl. Überexpression, induzierbar pfl. Überexpression, induzierbar	Ian Moore, Oxford, England Australien (http://www.pi.csiro.au/RNAi)
pENTR/D/TOPO	Entry-Vektor für GATEWAY cloning	Invitrogen
pDEST- ^{GW} SCYCE pDEST- ^{GW} VYNE	BifC Protein Interaktion	Prof. Dr. Kudla, (Universität, Münster)
pDR195	Hefekomplementation	Prof. Dr. N. von Wirén (IPK Gatersleben)

III.2.Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in Standardqualität und entsalzt von Metabion (Martinsried) bestellt.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3'-Orientierung)	Anwendung
AtmNiCo1 fw XhoI -TP AtmNiCo2 fw XhoI -TP At-NiCo1 fw XhoI At-NiCo2 fw XhoI At-NiCo1 rev BamHI +st At-NiCo2 rev BamHI +st PsmNiCo fw XhoI -TP PsmNiCo rev BamHI +st Ps-NiCo fw XhoI +TP	CTCGAGATGTCGGATGAATCGAAACCTAATC CTCGAGATGTCTCAAACCGATGCGTCGAAAC CTCGAGATGGAAAGGCTTCTTCAACCATC CTCGAGATGGATAGGCTTTTGAACCTC GGATCCTCAGTAGAGGCTAAAACCAAAG GGATCCTCAATACAGGCTGAATCCAAAG CTCGAGATGCAACCTAAAACTCACTTT GGATCCCTAGTACAACTAAATCCAAAAAAC CTCGAGATGGAGAACTTCTATCTTCTT	Hefekomplementation
AtPiC-TonB(-30) Sfil fw FoP#2 Sfil fw FoP#2 Sfil rev +st FoP#11-1 Sfil fw FoP#11-1 Sfil rev +st FoP#21 Sfil fw FoP#21 Sfil rev +st FoP#22 Sfil fw FoP#22 Sfil rev +st FoP#23 Sfil fw FoP#23 Sfil rev +st FoP#31 Sfil fw FoP#31 Sfil rev +st FoP#32 Sfil fw FoP#32 Sfil rev +st FoP#59 Sfil fw FoP#59 Sfil rev +st FoP#63a Sfil fw FoP#63a Sfil rev +st FoP#63a Sfil rev -st FoP#63b Sfil fw FoP#63b Sfil rev +st FoP#63b Sfil rev -st mCBY-Sfil fw mCBY-Sfil rev mCBY-Sfil rev-st mNAP13-Sfil fw mNAP13-Sfil rev mNAP13-Sfil rev-st mNAP14-Sfil fw mNAP14-Sfil rev mNAP14-Sfil rev-st	TAGGCCATTACGGCCATGGGGAGTATTGGTTTCTGGGGG TAGGCCATTACGGCCATGTGTTCTTCTTCATTTCATTG TTGGCCGAGGCGGCCTTAAACACACCGGAACGCCAGC TAGGCCATTACGGCCATGTGCGCATTGATCCGTGACG TTGGCCGAGGCGGCCTCAAATGAGCAAATGGCCAAAG TAGGCCATTACGGCCATGAGTGGCTTGGGAGCTTATGG TTGGCCGAGGCGGCCTCAAAAGAGCCAATTCACAC TAGGCCATTACGGCCATGGCGGTACGGAAGCGGCTAAG TTGGCCGAGGCGGCCTTAGGTGTAATCAGTTTGACG TAGGCCATTACGGCCATGTCAAGAGGTGGTGCCAAGAG TTGGCCGAGGCGGCCTCAATGCCTCTTGAGGGCGATG TAGGCCATTACGGCCATGGCAACCGCCGTGACAAAGAAG TTGGCCGAGGCGGCCTTACATGAATTCATGTGAAGCGC TAGGCCATTACGGCCATGGCGTCTCTGTCTAGCCGG TTGGCCGAGGCGGCCTCATCGATCATCATCATCTTG TAGGCCATTACGGCCATGGATTCCGTTACCTCGAG TTGGCCGAGGCGGCCTTATCTTCTCGAGTTGGTTTC TAGGCCATTACGGCCATGTGCGATGAATCGAAACCTAA TTGGCCGAGGCGGCCTCAGTAGAGGCTAAAACCAAAG TTGGCCGAGGCGGCCGAGTAGAGGCTAAAACCAAAG TAGGCCATTACGGCCATGTCTCAAACCGATGCGTCG TTGGCCGAGGCGGCCTCAATACAGGCTGAATCCAAAG TTGGCCGAGGCGGCCGAATACAGGCTGAATCCAAAG CGCGCCATTACGGCCATGGTCAGAGCCACCGTCGAC TTGGCCGAGGCGGCCTTAGACAAGAAAGTATTCAGAC TTAGGCCGAGGCGGCCATGACAAGAAAGTATCCAGAC TCCGGCCATTACGGCCATGGTTAGTACAAGACAAGG TAGGCCGAGGCGGCCTAGAACCAATTTGATC TTGGCCGAGGCGGCCTTAAGAACCAATTTGATC AAAGGCCATTACGGCCATGTGCATCGAGGTAGAGATGTC TAGGCCGAGGCGGCCATAAGTGGTGGACGTTCTGC TAGGCCGAGGCGGCCTAAAGTGGTGGACGTCCTGC	Hefe-Split-Ubiquitin
FoP#2TOPOfw FoP#2TOPOrev FoP#11-1TOPOfw FoP#11-1TOPOrev FoP#21TOPOfw FoP#21TOPOrev FoP#22TOPOfw FoP#22TOPOrev FoP#23TOPOfw FoP#23TOPOrev FoP#31TOPOfw FoP#31TOPOrev FoP#32TOPOfw FoP#32TOPOrev	CACCATGTCTCAACCACCGTGGAGATG AACACACCGGAACGCCAGCTC CACCATGGCTGCTGCTTCACTC AATGAGCAAATGGCCAAAGCTTC CACCATGTATAATAATATGGGACCCCCGGC AAAGAGCCAATTCACACTAATGTTACC CACCATGGAGAGATCCATTTCTTTAATCC GGTGAATCAGTTTGCAGGGTCAAG ACCATGGCGAAAGAGTCCACCACC ATGCCTCTTGAGGGCGATGGC CACCATGGGATTTTCCCGGCATATACAC CATGAATTCATGTGAAGCGCTAGAG CACCATGGAGGTTCTGGTAGGTTCTACG TCGATCATCATCATCTTGAAGAACTAG	GATEWAY-Klonierung

FoP#59TOPOfw FoP#59TOPOrev FoP#63aTOPOfw FoP#63aTOPOrev FoP#63aTOPOfw FoP#63aTOPOrev NiCo2 RNAi 2 fw NiCo2 RNAi 2 rev	CACCATGGCTTTCTCTCCTAATCCTC TCTTCCTCGAGTTGGTTTCTTGATG CACCATGGAAAGGCTTCTTCAACCATCTTC GTAGAGGCTAAACCAAAGAAAGGGC CACCATGGATAGGCTTTTGCACCTCC ATACAGGCTGAATCCAAAGAACTGG CACCGGAGCTGCTGTGGTTGGTGG AAGCTTTTCTCATCTGTTTCCCC	
matNAP13fw-Nco matNAP13fw-Xho matNAP14fw-Nco matNAP14fw-Xho mNiCo1 Ncol fw NiCo1 +TP Ncol fw NiCo1 AS1-140 XhoI rev +st mNiCo2 Ncol fw mNiCo1 80-268 BamHI rev -st mNiCo1 80-268 XhoI rev mNiCo1 80-366 XhoI rev -st mNiCo1 80-end XhoI rev mNiCo1 AS229-X Ncol fw mNiCo2 78-272 BamHI rev -st mNiCo2 78-272 XhoI rev mNiCo2 78-end Xho1 rev PsmNiCo 236-X Ncol fw PsmNiCo 63-X Ncol fw PsmNiCo fw-Ncol PsmNiCo fw BamHI -TP Ps-NiCo X-375 XhoI +st rev ! Ps-NiCo +TP Ncol fw Ps-NiCo x-148 XhoI +st rev	CCATGGTTAGTACAAGACAAGGTATA CTCGAGAGAACCAATTTGATCAATG ATCCATGGGCATCGAGGTTAGAGATGTCTGC GTTGCAGAACGTCCACCATTCTCGAGCT CCATGGCGTCGGATGAATCGAAACCTAATCCC CCATGGAAAGGCTTCTTCAACCAT CTCGAGTCACCAACCGGATTTAGC CCATGGCGTCTCAAACCGATGCGTCGAAAC GGATCCCTTCTTCTTTTGGGCAGTGGTAAG CTCGAGCTTCTTCTTTTGGGCAGTGGTAAG CTCGAGTCAGTAGAGGCTAAACCAAAGAAAG CTCGAGGTAGAGGCTAAACCAAAGAAAGGG CCATGGGAATCAAGGAAGCTTCTG GGATCCGCTTTTCTTCTTTAAGCTTTTCTCATCTG CTCGAGCTTTTCTTCTTTAAGCTTTTCTCATCTG CTCGAGATACAGGCTGAATCCAAAGAACTGG CCATGGGAATCAAGGAAGCTTCAG CCATGGAGAGACAACCTAAAACTCAC CCATGGCGCAACCTAAAACTCACTTTC GGATCCATGCAACCTAAAACTCACTTT CTCGAGCTAGTACAACTAAATCCAAAAAAC CCATGGAGAACTTCTATCTTCTTCC CTCGAGCTAGAGCTCGGCACGGATA	Überexpression
mPIC1 V43P fw mPIC1 V43P rev mPIC1 V43P rev II mPIC1 V44P fw mPIC1 V44P rev mPIC1 V44P rev II NiCo2-till Seq. #5-8 fw NiCo2-till Seq. #5-8 rev NiCo2-till Seq. #9-13 fw NiCo2-till Seq. #9-13 rev	CAGCTTGTTGTCAACTCCTGTTGCAGCTGTG CACAGCTGCAACAGGAGTTGACACAAGCTG AGTTGACACAAGCTGCCCCAGAAACCAATAC CTTGTTGTCAACTGTGCCTGCAGCTGTGATTC GAATCACAGCTGCAGGCACAGTTGACACAAG CACAGTTGACACAAGCTGCCCCAGAAACC CCTTGAGATTGTTCACTGTTCTGTATC CAAGTTCTTATAACTTCAATGTGGAGCC CCAACAAAATTTGTATCTTTGCTTCAG GACGAGAATGGAGAGTGCTGCC	Mutagenese
LB2SAIL LBa1_SALK NiCo_SAIL1055 fw NEU NiCo1_SAIL1055 rev NEU Attb1 Attb2 popOff-INT seq fw popOff-INT seq rev	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA TGTTTCACGTAGTGGGCCATCG TGCAACAGTCCCAGATTCCGTCAC TTGATACCATGCTGATGTGGTTTC ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TGAGCTTTGATCTTTCTTTAACTG TGTTAGAAATCCAATCTGCTTGTA	PCR-Genotypisierung <i>nico1-1</i>
NiCo1 LCfw NiCo1 LCrev NiCo2 LCfw NiCo2 LCrev 16.3 fw 16.3 rev AtFe-PbLCfw AtFe-PbLCrev Actin2/8 fw Actin2/8 rev	ACATCAGCATGGTATCAAC ATAGCCACAAGTGACGA CGGAACCATGTGTTGTAC AGCTACAAAGACTTGACG TGCTGGGACTATTACGG TCTCGACGGTGTAAGG CTCCGTCGAACCTCCA AACTACGACAGATTCCG GGTGATGGTGTGTCT ACTGAGCACAATGTTAC	Quantitative RT-PCR
NiCo2 PEA contig fw NiCo2 PEA contig fw	TCGGGGTAATCAAAAACACACTTTC TAGTTCTTAAGCTGAAGAATAAATCCAACCTAC	Subclonierung NiCo aus Erbse

III.3.Chemikalien

Die Chemikalien wurden von Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Difco (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim), GibcoBRL (Paisley, UK), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Penzberg) und Serva (Heidelberg) bezogen.

III.4.Enzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) bezogen. T4-Ligase wurde von MBI sowie Invitrogen (Karlsruhe), Taq-Polymerasen von Diagonal (Münster), Eppendorf, MBI Fermentas, Clontech (Saint-Germainien-Laye, Frankreich) und Finnzymes (Espoo, Finnland) bestellt. Reverse Transkriptase wurde bezogen von Promega (Madison, USA), RNase freie DNase I von Roche (Mannheim), Thermolysin von Merck (Grafing), RNase von Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden). Cellulase und Macerozyme R10 wurden von Yakult (Tokyo, Japan) und Serva (Heidelberg) bestellt.

III.5.Molekulargewichts- und Größenstandards

Als Größenstandard für Agarose-Gelelektrophorese wurde mit PstI geschnittene DNA des Phagen λ (MBI Fermentas) verwendet. Als Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE diente ein "Low Molecular Weight Marker" von Sigma-Aldrich (St. Gallen, Schweiz; α -Lactalbumin [14,2kDa], Trypsin-Inhibitor [20,1kDa], Trypsinogen [24kDa], Carboanhydrase [29kDa], Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase [36kDa], Ovalbumin [45kDa] und Rinderserumalbumin [66kDa]) oder ein peqGOLD Protein Marker I von Peqlab (Erlangen; β -Galaktosidase [116kDa], Rinderserum-Albumin [66,2kDa], Ovalbumin [45kDa], Laktat-Dehydrogenase [35kDa], RE Bsp981 [25kDa], β -Laktoglobulin [18,4kDa], Lysozym [14,4kDa])

III.6. Antiseren

Folgende primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit generiert: Ps-NiCo (C-terminal, Aminosäuren 236-375 aus Erbse); AtNAP13 (maures Protein aus *Arabidopsis*); AtNAP14 (maures Protein aus *Arabidopsis*). Die Überexpression der entsprechenden Proteine sowie deren Aufreinigung sind unter IV.4.8 beschrieben. Die aufgereinigten Proteine wurden für die Immunisierung von Kaninchen an Pineda Antikörperservice (Berlin) gesandt. Für primäre Antikörper gegen At-NiCo1, At-NiCo2 und Ps-YGGT wurden Kaninchen mit von Pineda Antikörperservice synthetisch hergestellten Peptiden immunisiert. Primäre Antikörper gegen AtPIC1, PsLSU, PsLHCP, PsOEP16.1, PsTic62 waren in der Arbeitsgruppe schon verfügbar.

III.7. Bakterienstämme

Für die Klonierung in *E.coli* Zellen wurden folgende Stämme verwendet: DH5- α (Invitrogen, Karlsruhe), TOP10 (Invitrogen), BL21 (DE3) (Novagen/Merck, Darmstadt). Für die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit *Agrobacterium tumefaciens* wurde der Stamm GV3101::pMK90RK (Koncz und Schell, 1986; bezogen von Dr. J. Meurer, Department Biologie I, Botanik, LMU München) verwendet. Die transiente Transformaton von *Nicotiana benthamiana* wurde mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL1, bezogen von Dr. Thomas Ott (Department Biologie I, Botanik, LMU München) durchgeführt.

III.8. Pflanzenmaterial

Für alle Experimente mit *Arabidopsis thaliana* wurden Pflanzen des Ecotyps Col-0 (Columbia 0, Lehle seeds, Round Rock, USA) verwendet. Erbsen (*Pisum sativum*) der Sorte "Arvica" wurden vom Bayrischen Futtersaatbau (Ismaning, Deutschland) bezogen. Die *NiCo1* T-DNA-Linie SAIL_1055 (Alonso *et al.*, 2003) sowie die Punktmutationslinien (N92203, N94702, N93683, N91284, N91253, N93723) des *NiCo2*-Gens wurden von NASC (University of Nottingham, GB) geliefert. Die verwendeten Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) wurden von Dr. Thomas Ott (Department Biologie I, Genetik, LMU München) bezogen.

IV. METHODEN

IV.1. Pflanzenphysiologische Methoden

IV.1.1. Saatgut und Anzuchtbedingungen

Die Aussaat von *Arabidopsis thaliana* Samen auf Erde erfolgte direkt. Für die Einzel-Aussaat auf MS-Agarmedium (0,215% MS; 0,05% MES; 0,2-0,3% Gelrite; 1% Saccharose; pH 5,8 mit KOH) wurden die Samen vorher mit 70% EtOH (1-2min) und 6% Hypochlorid plus 0,05% Tween20 (3-5min) sterilisiert und anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden die Samen direkt auf das Medium oder auf die auf dem Medium befindlichen PROPYLTEX-Netze (Maschengröße 210µm, bezogen von SEFAR, Schweiz) ausgelegt. Zur Selektion von transformierten *Arabidopsis* Pflanzen wurde dem MS-Agar entsprechendes Antibiotikum (50µg/ml Hygromycin oder 100µg/ml Kanamycin) zugesetzt. Zur Aussaat von größeren Mengen Samen wurden diese in einem Exsikkator durch Bedampfung mit einem sterilisierenden Gas, entstehend aus 10ml 12%iges Hypochlorid, 1ml rauchender Salzsäure, 12 Stunden trockensterilisiert. Die Samen wurden anschließend auf das Medium gestreut.

Zur Induktion der Keimung wurden die Samen 1-3 Tage stratifiziert (dunkel, 4°C). Die Anzucht erfolgte anschließend unter einem kontrollierten Langtag-Zyklus von 16h Licht (100 µmol Photonen m⁻² s⁻¹, 21°C) und 8h Dunkelheit bei 16°C. Eine Anzucht unter Niedriglicht (10µmol m⁻² s⁻¹; 16h Licht, 8h Dunkel) bzw. Dauerlicht (100µmol m⁻² s⁻¹; 24h Licht) erfolgte zur Phänotypisierung von Mutanten.

IV.1.2. Transiente Transformation von Protoplasten aus *Arabidopsis*

Protoplastenisolation

Vor Beginn der Isolation wurde eine Enzymlösung (1% Cellulase R10; 0,3% Macerozym R10; 400mM Mannitol; 20mM KCl; 20mM MES, pH 5,7) angesetzt und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. 10mM CaCl₂ und 0,1% BSA wurden nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur zugesetzt. Die Enzymlösung wurde sterilfiltriert (0,45µm-Sterilfilter, Whatman/Schleicher & Schüll), direkt auf 0,5-1g Blattmaterial von drei bis vier Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen gegeben und dieses dann mit einer Rasierklinge sehr fein gehackt. Die Enzymlösung wurde samt den Blattstückchen in einen 100ml-Vakuumkolben überführt, etwa 20sec vakuuminfiltiert, anschließend 2h unter Schütteln (40rpm) abgedunkelt inkubiert und die Protoplasten wurden dann bei 80rpm für 1min freigesetzt. Nach dem Filtern der

Protoplasten-Suspension durch ein Nylon-Netz (100µm Maschengröße) in ein 15ml COREX-Röhrchen wurden die Protoplasten bei 100xg, 4°C für 2min in einem Ausschwingrotor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in 1ml W5-Lösung (154mM NaCl; 125mM CaCl₂; 5mM KCl; 2mM MES, pH 5,7; Osmolarität: 550-580mOsm, 4°C) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und anschließend weitere 9ml W5-Lösung vorsichtig zugegeben. Es folgte ein erneutes Pelletieren unter gleichen Bedingungen und eine anschließende Aufnahme der Protoplasten in 5ml W5-Lösung gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. 25µl der Protoplastensuspension wurden mit 75µl W5-Lösung verdünnt und 20µl der Verdünnung auf eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Nach Auszählung der intakten Protoplasten aus sechs bis zehn Kleinquadraten wurde der Mittelwert bestimmt und die Anzahl der lebenden Protoplasten in der Gesamtlösung nach folgender Formel errechnet:

$$n = (\text{Protoplasten-Mittelwert} / 0,2\mu\text{l}) \times 5000\mu\text{l}$$

Nach der 30-minütigen Inkubation wurden die Protoplasten erneut pelletiert, der Überstand abgenommen und die Protoplastenkonzentration mit MMg-Lösung (400mM Mannitol; 15mM MgCl₂; 4mM MES, pH 5,7; Osmolarität: 540mOsm, 4°C) auf 400 Protoplasten pro µl eingestellt.

PEG-Transformation

Für die Transformation der Protoplasten mit den entsprechenden GFP-Fusionskonstrukten wurden 10µl Plasmid-DNA (1-2µg/µl) und 100µl Protoplasten-Suspension in einem 2ml Reaktionsgefäß vorsichtig unter Schwenken gemischt. Nach der Zugabe von 110µl PEG/Ca (40% [v/v] PEG4000; 200mM Mannitol; 100mM Ca(NO₃)₂) und vorsichtigem Durchmischen folgte eine 10 minütige Inkubation im Dunkeln. Anschließend wurde unter vorsichtigem Mischen 500µl W5-Lösung zugegeben und die Protoplasten-Suspension bei 100xg für 1min pelletiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Protoplasten-Pellet in 1ml W5-Lösung resuspendiert, in eine kleine Petrischale (Durchmesser 40mm) überführt und über Nacht bei 16-21°C für 20h im Dunkeln inkubiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur und mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt.

IV.1.3. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte, stabile Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde in Anlehnung an die Methode von Bechthold *et al.*, 1993) durchgeführt. Eine Vorkultur von 10ml LB-Flüssigmedium wurde mit Agrobakterien, welche mit dem jeweiligen Konstrukt transformiert wurden, drei Tage vor der Transformation angeimpft, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und unter Schütteln bei 28°C für ca. 48h inkubiert. Ca. 24h vor der Transformation wurde eine 500ml-Hauptkultur mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit der jeweiligen Vorkultur angeimpft und wiederum bei 28°C unter Schütteln für etwa 24h inkubiert. Den *Arabidopsis*-Pflanzen wurden 24h vor der Transformation die bereits entwickelten Schoten entfernt und die Pflanzen anschließend luftdicht abgedeckt um eine maximale Öffnung der Stomata zu erreichen. Die 500ml-Hauptkultur wurde am Tag der Transformation bei 5500xg für 15min zentrifugiert und das Pellet der transformierten Agrobakterien in 400ml Infiltrationsmedium (5% Saccharose; 0,215% MS; 0,02% Tween 20) resuspendiert. Vier *Arabidopsis*-Pflanzen wurden anschließend kopfüber in die Agrobakterien-Suspension getaucht. In einem Exsikkator erfolgte eine fünfminütige Infiltration unter Vakuum nach der die Pflanzen horizontal auf ein Papiertuch gelegt und wieder luftdicht abgedeckt wurden. Am Folgetag wurden die Pflanzen mit Wasser gewaschen und unter Langtagbedingungen bis zur Samenabreife in der Klimakammer angezogen. Die Selektion der T1-Samen auf das transformierte Konstrukt erfolgte auf, mit dem entsprechendem Antibiotikum versetztem, MS-Agar.

IV.1.4. Induzierbarer Proteinverlust und Protein-Überexpression

Für die Verwendung von induzierbaren "knock down"- bzw. Überexpressions-Systemen, mit den Vektoren pOpOFF2 und pOpON2, wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen mit den entsprechenden Konstrukten, wie unter IV.1.3 beschrieben, transformiert und selektiert. Die Induktion beider Systeme erfolgte durch Zugabe von 10µM Dexamethason in das Kultivierungsmedium oder in das Gieswasser. Heterozygote Samen der T2-Generation (heterozygot auf das transformierte pOpON- oder pOpOFF-Konstrukt) wurden auf, mit entsprechendem Antibiotikum versetztem, MS-Medium selektiert. Homozygote Samen der T3-Generation konnten direkt verwendet werden.

IV.1.5. Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Infiltration

Ein Tag vor der Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde eine Vorkultur (Volumen 3ml LB-Flüssigmedium), versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, mit transformierten Agrobakterien angeimpft und bei 28°C unter Schütteln für 24h inkubiert. Am Folgetag wurden die zu transformierenden Tabakpflanzen gut gewässert. Die Vorkultur wurde in 30ml LB-Flüssigmedium überführt, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, und für 4h bei 28°C unter Schütteln weiter inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 4000xg für 15min bei Raumtemperatur. Das Pellet wurde in Infiltrationsmedium (10mM MES, 10mM MgCl₂) resuspendiert, die Suspension mit 200µM Acetosyringon versetzt und bei 28°C und 75rpm inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000xg für 15min bei Raumtemperatur und eine anschließende Resuspension des Bakterienpellets in 5ml 5%iger Saccharoselösung. Von der Suspension wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) bestimmt und durch weitere Zugabe von 5%iger Saccharoselösung auf 0,6-0,8 eingestellt. Die Infiltration der Tabakpflanzen mit der Bakteriensuspension erfolgte durch Injektion mit einer Spritze durch die Stomata der Tabakblätter. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen mit Wasser benetzt, luftdicht abgedeckt und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Abdeckung entfernt. Um die GFP-Fluoreszenzbilder aufzunehmen, konnten nach weiteren 24-48h Mesophyll-Protoplasten isoliert oder ganze Blattstücke für das konfokale Laserscanning-Mikroskop (TCS-SP5, Leica, Wetzlar) präpariert werden.

Protoplastenisolation

Vor Beginn der Isolation wurden aus 1% Cellulase R10, 0,3% Macerozym R10 eine Enzymlösung in 10ml sterilem F-PIN Puffer hergestellt und diese für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Enzymlösung 0,1% BSA zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert (0,45µm-Sterilfilter, Whatman/Schleicher & Schüll), direkt auf 0,5-1g Blattmaterial eines infiltrierten Blattes gegeben und dieses dann mit einer Rasierklinge grob gehackt. Die Enzymlösung wurde samt der Blattstückchen in einen 100ml-Vakuumkolben überführt und etwa 20sec vakuuminfiltriert. Anschließend erfolgte eine Inkubation, abgedunkelt, für 1,5h bei 40rpm schütteln. Im Anschluss wurden die Protoplasten bei 80rpm für 1min freigesetzt. Nach dem Filtern der Protoplasten-Suspension durch ein Nylon-Netz (100µm Maschengröße) in ein 15ml COREX-Röhrchen wurde die Protoplastenlösung mit 2ml F-PCN-Lösung überschichtet und bei 70xg, 4°C, 10min (niedrige Beschleunigung und Bremse) in einem Ausschwingrotor

pelletiert. Die intakten Protoplasten wurden zwischen der Enzymlösung und der F-PCN Lösung vorsichtig abgenommen und mit 10ml W5-Lösung gewaschen. Es folgte ein Pelletieren bei 50xg, 4°C, für 10min und eine anschließende Aufnahme der Protoplasten in 0,5-1ml W5-Lösung. Diese konnten unter einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS-SP5, Leica, Wetzlar) untersucht werden.

F-PIN Puffer (500ml): Makro-MS-Salze (modifiziert); 20mM MES; 0,5ml 1000x Micro-MS; 1ml 500x PC Vitamine; 20mM NH₄-Succinat; mit ca. 55g Saccharose (ultrapur) auf 550mOsm eingestellt, pH 5,8 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert

F-PCN Puffer (500ml): Makro-MS-Salze (modifiziert); 20mM MES; 0,5ml 1000x Micro-MS; 1ml 500x PC Vitamine; 20mM NH₄-Succinat; mit ca. 40g Glucose auf 550mOsm eingestellt; pH 5,8 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert

Makro-MS-Salze (modifiziert): je 20mM KNO₃, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄

1000x Micro-MS (100ml): 83mg KJ, 620mg K₂BO₃, 2230mg MnSO₄, 860mg ZnSO₄, 25mg Na₂MoO₄, 2,5mg CuSO₄, 2,5mg CaCl₂

500x PC Vitamine (100ml): 10g Myo-Inosit, 100mg Pyridoxin-HCl, 50mg Thiamin-HCl, 100mg Nicotinsäure, 1g Biotin, 100mg Ca-Panthotenat

IV.2. Mikrobiologische Methoden

IV.2.1. Medien und Anzucht

Escherichia coli und *Agrobacterium tumefaciens*

Die verwendeten *E.coli*-Stämme DH5 α , BL21 und TOP10 (Invitrogen) wurden standardmäßig bei 37°C unter Schütteln in LB-Flüssigmedium (1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl) angezogen. Bei der Anzucht auf LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5% Agar, sowie das der Resistenz des transformierten Plasmid-Vektors entsprechende Antibiotika (100 μ g/ml Ampicillin, 50 μ g/ml Kanamycin oder 100 μ g/ml Spectinomycin) zugesetzt.

Für die Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMK90RK (Koncz und Schell, 1986) eingesetzt. Die Anzucht erfolgte standardmäßig bei 28°C in LB-Flüssigmedium (unter Schütteln) oder auf LB-Agarplatten, versetzt mit 50 μ g/ml Kanamycin (Resistenz Stamm GV3101), 100 μ g/ml Rifampicin (Resistenz Ti-Plasmid), 100 μ g/ml Spectinomycin (Resistenz transformierter Plasmid-Vektor). Für die Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 verwendet. Die Anzucht erfolgte standardmäßig bei 28°C in LB-Flüssigmedium (unter

Schütteln) oder auf LB-Agarplatten unter Zugabe folgender Antibiotika: 100µg/ml Spectinomycin (Resistenz transformierter Plasmid-Vektor) und 100 mg/ml Carbenecilin (Resistenz AGL1).

Saccharomyces cerevisiae

Für das Split-Ubiquitin-System wurde der Hefestamm NMY51 (MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)₄-HIS3 ura3::(lexAop)₈-lacZ ade2::(lexAop)₈-ADE2 GAL4) verwendet. Die Anzucht erfolgte in YPD-Flüssigmedium (2% Pepton; 1% Hefeextrakt; 1% Glukose) für 24-48h bei 30°C, unter Schütteln (200rpm). Für die Kultivierung auf Medium-Platten wurde dem Flüssigmedium 2% Agar zugesetzt. Die Anzucht auf Platten erfolgte bei 30°C für 3-5 Tage.

IV.2.2. Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach Hanahan, 1983). Die Bakterien wurden durch Hitzeschock zur Aufnahme der Plasmid-DNA veranlasst (Maniatis *et al.*, 1982).

Für die Herstellung kompetenter Agrobakterien GV3101 und AGL1 wurde eine Vorkultur aus 3ml LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika (GV3101: 100µg/ml Kanamycin; 100µg/ml Rifampicin; AGL1: 100µg/ml Carbenicilin) versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50ml LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit der 3ml Vorkultur angeimpft. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 28°C unter Schütteln. Am Folgetag wurden die Bakterien bei 6000xg, 10min bei 4°C pelletiert und in 50ml TE (10mM Tris-HCl, pH 8; 10mM EDTA) gewaschen. Nach einer erneuten Pelletierung bei 6000xg, 10min bei 4°C wurde das Bakterienpellet in 5-10ml LB-Flüssigmedium aufgenommen, in 0,2ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

Für die Transformation kompetenter Agrobakterien, wurden 0,1-0,5µg Plasmid-DNA zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 5min in flüssigem Stickstoff, gefolgt von 5min bei 37°C, inkubiert. Nach der Zugabe von 800µl LB-Medium wurden die Zellen 2-4h bei 28°C geschüttelt (180rpm) und anschließend bei 4000xg für 1,5min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in etwa 100µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Platten, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika (GV3101: 100µg/ml Kanamycin; 100µg/ml Rifampicin; AGL1: 100µg/ml Carbenicilin;

sowie dem Antibiotikum, entsprechend der vermittelten Resistenz des transformierten Vektors), ausgestrichen.

Saccaromyces cerevisiae

Der NMY51-Hefestamm wurde nach der Lithium-Acetat-Methode von Gietz und Schiestl, 1991) transformiert. Zunächst wurde eine Vorkultur aus YPD-Flüssigmedium angeimpft, über Nacht angezogen und am Folgetag zum Animpfen einer Hauptkultur (50ml YPD-Flüssigmedium) mit einer optischen Dichte von 0,15 (OD₆₀₀) verwendet. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 durch Zentrifugation für 3min bei 1000xg. Die Zellen wurden einmal in ein Volumenanteil H₂O, sowie einmal in 1/4 Volumenanteil LiSorb (100mM LiOAc; 10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA; 1M Sorbitol) gewaschen und pro 50ml Hauptkultur in 300µl LiSorb resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 7µl einzelsträngiger „Carrier-DNA“ (2mg/ml Deoxyribonucleinsäure-Natriumsalz Type III aus Lachssperma, Sigma-Aldrich) pro 50ml Hauptkultur. Anschließend wurden die Zellen zu 50µl aliquotiert, direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Ein Aliquot kompetenter Hefezellen wurde für die Transformation mit 1-2µg Plasmid-DNA und 300µl LiPEG (100mM LiOAc; 10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA; 40% PEG3500) gut vermischt und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 35µl DMSO zugefügt und es erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad für 15min bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend 2min bei 150xg pelletiert, anschließend in 150-300µl 0,9% NaCl aufgenommen und auf Selektions-Platten (SD-ura) ausgebracht. Die Inkubation erfolgte für mehrere Tage bei 30°C bis Einzelkolonien sichtbar waren.

IV.2.3. Split-Ubiquitin-System

Kompetente NMY51-Hefezellen wurden, entsprechend dem folgenden Interaktionstest, mit dem "Bait"-Konstrukt vortransformiert und auf den Transformationskontrollplatten SD-Leu (0,67% YNB [Yeast Nitrogene Base, ohne Aminosäuren]; 0,2% Dropout-Mix; 2% Glucose) ausgestrichen und bei 30°C angezogen. Transformierte Zellen wurden nach IV.2.2 wiederum kompetent gemacht und für den Interaktionstest mit dem entsprechenden "Prey"-Konstrukt transformiert. Die transformierten Zellen in 300µl 0,9% NaCl aufgenommen und je 100µl auf die Transformationskontrollplatten SD-Trp-Leu sowie auf die Interaktionsplatten SD-Trp-Leu-His und SD-Trp-Leu-His-Ala aufgeteilt. Dem jeweils verwendeten Dropout-Mix (4,3% (w/w) der Aminosäuren Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Myo-Inositol, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Uracil und Valin sowie 1% Adenin, 8,5% Isoleucin und 0,4% para-

Aminobenzoesäure) wurden entsprechend dem durchgeführten Experiment die Aminosäuren Alanin, Histidin, Leucin und Tryptophan zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für drei Tage. Die Anzahl der Kolonien auf den Interaktionsplatten wurde prozentual mit der Kolonienanzahl auf der Transformationskontrollplatte verglichen.

IV.3. Molekularbiologische Methoden

IV.3.1. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988) wurden die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Fragmente zur Klonierung in Plasmid-Vektoren generiert und PCR-Genotypisierung durchgeführt. Die PCR-Ansätze erfolgten nach Angaben der Enzymhersteller. Verwendete DNA-Polymerasen: PhusionTM-Polymerase (New England Biolabs, USA), DFS *Taq*-Polymerase (Bioron GmbH, Deutschland).

IV.3.2. Klonierungsstrategien

DNA-Gelelektrophorese, Restriktionsverdau von Plasmid-DNA sowie die Ligation von DNA erfolgten nach Standardmethoden (Maniatis *et al.*, 1982) sowie nach Angaben der Enzymhersteller. Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Gel-Extraktion Kit QIAEX® II von Qiagen (Hilden, Deutschland). Für die Durchführung der LR-Rekombination mit dem GATEWAY System (Invitrogen) wurde ebenso nach den Angaben des Herstellers verfahren. In die, für das Hefe-Split-Ubiquitin-System verwendeten Plasmid-Vektoren, wurde in Anlehnung an das "DUALmembrane kit 3 user manual" der Herstellerfirma subkloniert.

IV.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*-Zellen wurde in Anlehnung an das Protokoll von Zhou *et al.* (1990) durch alkalische Lyse mit SDS und NaOH aus 3,5ml-Übernachtskulturen durchgeführt. Größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der "Nucleobond AX" Plasmid Purification Midi ("AX100") und Maxi ("AX 500") Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

IV.3.4. Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolation von genomischer DNA aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurden zwei bis drei Blätter mit 450µl Extraktionspuffer (0,2M Tris-HCl, pH 7,5; 0,25M NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS; 100µg/ml RNase) in einer Kugelmühle („Tissue Lyser“, Retsch / Qiagen) für 3min zerkleinert und für 10min bei 37°C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit 300µl Isopropanol gefällt und der Ansatz für 5min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 16000xg und 4°C für 5min wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8; 0,1mM EDTA) resuspendiert. Für einen PCR-Ansatz (25µl) zur Identifizierung und Genotypisierung von mutierten Pflanzen wurden 5µl DNA eingesetzt.

IV.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration wurde mittels photometrischer Messung der Absorption einer verdünnten Probe nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Die Messung erfolgte bei 260nm und 320nm. Der Konzentrationsberechnung (µg/µl) liegen folgende Formeln zu Grunde:

$$\text{DNA:} \quad c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,05 \times f_{\text{verd}}$$

$$\text{RNA:} \quad c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,04 \times f_{\text{verd}}$$

E = Absorption der Probe; f_{verd} : Verdünnungsfaktor der Probe. Durch die Messung der Absorption bei 280nm und der Bestimmung des Verhältnissen E_{260}/E_{280} konnte eine Verunreinigung mit Proteinen überprüft werden. Bei hochreinen Nukleinsäuren beträgt das Verhältnis 1,8.

IV.3.6. PCR-Genotypisierung

Die *nico1-1* T-DNA-Insertionslinie

Die Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinie *nico1-1* (SAIL_1055) erfolgte durch PCR. Um homozygote Pflanzen, welche in beiden Allelen eine T-DNA-Insertion in dem *NiCo1*-Gen tragen, zu identifizieren, wurden die flankierenden Oligonukleotid-Primer Sail1055-fw und Sail1055-rev zur vorhergesagten T-DNA-Insertionsstelle verwendet. Bei der DNA aus homozygoten Linien konnte daher kein Produkt amplifiziert werden, wohingegen bei DNA aus heterozygoten Linien ein PCR-Produkt von 601bp erzeugt wurde. Eine Kombination des genspezifischen Oligonukleotid-Primer Sail1055-rev mit dem Oligonukleotid-Primer LB2SAIL ergab ein spezifisches PCR-Produkt von 333bp auf Linien mit einer T-DNA Insertion.

Die *NiCo1/NiCo2*-Doppelmutante (*nico1/2-dm*)

Nach der durch Agrobakterien vermittelten, stabilen Transformation von *nico1-1*-Einzelmutanten mit dem pOp6::NiCo2-RNAi-Konstrukt und der positiven Selektion über den pflanzlichen Selektionsmarker Hygromycin (25µg/ml) selektiert, wurde die DNA der transgenen Pflanzenlinien in der T1-Generation auf genomischer Ebene auf die Insertion des Konstrukts untersucht. Die PCR mit den spezifischen Primern der Transformationskassette popOff-INT-fw und popOff-INT-rev ergab ein spezifisches PCR-Produkt von 494bp.

***NiCo1*-Überexpressionslinie**

Arabidopsis-Pflanzen des Ecotyps Col-0 wurden Agrobakterien vermittelt mit dem pOp6::NiCo1-Konstrukt stabil transformiert und über den pflanzlichen Selektionsmarker Kanamycin (100µg/ml) selektiert. Die Insertion des Konstrukts wurde in der T1-Generation, mittels PCR-Analyse auf genomischer DNA der transgenen Pflanzenlinien, überprüft. Es wurde eine Primerkombination aus dem genspezifischen Oligonukleotid-Primer NC1-230bp-rev und dem Primer attB1, welcher an die Rekombinationsstelle des binären Vektors bindet, verwendet. Das spezifische PCR-Produkt von ca. 300bp zeigte eine Insertion in zumindest einem Allel an.

IV.3.7. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von generierten Subklonen und von Produkten aus der PCR-Genotypisierung wurden von dem Sequenzierservice des Departments Biologie 1 der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

IV.3.8. RNA-Präparation von *Arabidopsis thaliana*

Für jede RNA-Isolation aus Blattmaterial wurde ein mittelgroßes, junges Blatt, zur Analyse von Keimlingen wurden jeweils zehn Keimlinge geerntet. Nach der Ernte wurde das Pflanzengewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

IV.3.9. Reverse Transkription

Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte in einem Volumen von 10µl unter Verwendung von 0,5-1,0µg RNA, 4µM oligo-dT-Primer und 0,5mM dNTP. Einer Inkubation für 2min bei 70°C und anschließendem Abkühlen auf Eis folgte die Zugabe von 2 Units

MMLV reverser Transkriptase (Promega, Mannheim) und eine anschließende Inkubation für 1,5h bei 42°C.

IV.3.10. Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Für die PCR mit dem "FastStart DNA Master SYBR-Green PLUS" Kit (Roche, Deutschland) wurde die cDNA 1:20 verdünnt. Der Ansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt, in Glaskapillaren (Roche) überführt und in einem LightCycler (Roche) durchgeführt. Es wurden 45 Zyklen durchlaufen:

1sec bei 95°C (Denaturierung)

7sec bei 49°C (Annealing)

19sec bei 72°C (Elongation)

5sec bei 95°C (Denaturierung)

Die Oligonukleotid-Primer wurden für die Amplifikation der spezifischen PCR-Produkte in folgenden Kombinationen verwendet: *NiCo1*: NiCo1_LCfw/NiCo1_LCrev; *NiCo2*: NiCo2_LCfw/NiCo2_LCrev; *PIC1*: AtFe-PbLCfw/AtFe-PbLCrev. Zur Quantifizierung der Daten wurden die genspezifischen Signale auf die in den Proben enthaltene Ausgangsmenge an RNA-Molekülen von PRAT3 bezogen. Die Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts von PRAT3 erfolgte mit den Oligonukleotid-Primern 16.3_LCfw/16.3_LCrev. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer untersuchten Probe konnte daher anhand folgender Beziehung berechnet werden:

$$\text{Relativer Gehalt an cDNA} = 2^{[n(\text{PRAT.3})-n(\text{Gen})]}$$

n bezeichnet die Anzahl der Zyklen, bei der die Menge des jeweiligen Amplifikats einen festgelegten Schwellenwert überstieg. Dieser war identisch für das genspezifische und für das PRAT3 Signal. Die Bestimmung wurde in jeder PCR so durchgeführt, dass die Messpunkte innerhalb der exponentiellen Phase der PCR lagen. Der Transkriptgehalt wurde jeweils in mindestens drei biologischen Wiederholungen bestimmt.

IV.3.11. Affymetrix Microarray-Analyse

Für die Isolation der RNA wurden 50-75mg unter Stickstoff gepulvertes Pflanzenmaterial von null, zwei und sieben Tage induzierten (14, 16 bzw. 21 Tage alten) *nico1/2-dm Arabidopsis* Mutanten (Linie #4 und Linie #8), Wildtyppflanzen des Ecotyps Col-0 sowie einer Kontrolllinie (Luciferase Gen in pOpOFF2-Vektor) verwendet. 200ng RNA von je drei unabhängigen Proben (n=3) wurden mit Hilfe des "3' IVT Express" kits (Affymetrix UK, High Wycombe, UK) nach Herstellerangaben gelabelt auf Affymetrix "GeneChip *Arabidopsis*

ATH1 Genome Arrays" hybridisiert. Die Auswertung und Berechnung der statistisch signifikant regulierten Gene, im Vergleich von *nico1/2-dm* gegen Wildtyp-Kontrolllinien, erfolgte mit Hilfe der Robin/MapMan Software wie unter Duy *et al.*, 2011 beschrieben. Die Hybridisierung der Microarrays sowie die statistische Analyse der Daten wurde von Karl Mayer und Dr. Katrin Philippa (Department Biologie I, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, LMU München) durchgeführt.

IV.4. Biochemische Methoden

IV.4.1. Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Proteinextraktion aus Blattmaterial wurde dieses in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver mit 400-800µl Extraktionspuffer (50mM Tris-HCl, pH8; 2% LDS; 0,1mM PMSF) versetzt und gut gemischt. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis folgte eine Zentrifugation von 15min bei 16000xg und 4°C, um die unlöslichen Bestandteile zu sedimentieren. Von dem Überstand, in welchem sich die Proteine befinden, wurden 15µl zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Der restliche Überstand wurde sofort mit 50mM EDTA, 10mM DTT versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

IV.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-PAGE

Die Proben wurden vor dem Auftragen 3-5min bei 95°C in Laemmli-Puffer (4x: 250mM Tris-HCl, pH6,8; 40% Glycerin; 9% SDS; 20% β-Mercaptoethanol; eine Spatelspitze Bromphenolblau) für 5min auf 96°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine elektrophoretisch in denaturierenden Gelen nach Laemmli (1970). Die Acrylamid-Konzentrationen betrugen zwischen 10-15%. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid betrug 30:0,8. Für das Sammelgel wurde 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 und für das Trenngel 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 verwendet.

Bis-Tris SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (NuPAGE)

Der Auftrag der Proben erfolgte hier auf ein Bis-Tris-Gel (0,36M Bis-Tris-HCl, pH 6,5-6,8) bei einer Acrylamidkonzentration von 10%. Ein spezieller MES-Laufpuffer (50mM MES; 50mM Tris; 1mM EDTA; 1mM NaHSO₃; 0.1% SDS) wurde verwendet.

Coomassie-Blaufärbung

Die Anfärbung der mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte direkt im Gel für 15-30min mit Coomassie-Färbelösung (50% MeOH; 7% HAc; 0,18% Coomassie Brilliant Blue R250) unter Schütteln. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärbe-Lösung (0% H₂O; 40% Methanol; 10% Eisessig). Die Gele wurden gewässert und unter Vakuum getrocknet.

Silberfärbung

Für die sensitive Anfärbung von mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen durch Silber wurde das Gel in Entfärber-Lösung (50% H₂O; 40% Methanol; 10% Eisessig) für 1,5h fixiert und anschließend dreimal in 50%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte eine Inkubation von einer Minute in Sensi-Puffer (100mg Na₂S₂O₃ / 200ml H₂O) und 20 Minuten in frisch angesetzter Lösung F (in 50ml H₂O: 100mg Silber; 75µl HCOH). Das Gel wurde folgend zweimal für 20sec mit H₂O gewaschen. Die Entwicklung der Silberfärbung wurde in Lösung E (in 50ml H₂O: 3g Na₂CO₃; 1ml Sensi-Puffer) bis zur ausreichenden Färbung der Proteinbanden durchgeführt und mit Entfärber-Lösung gestoppt.

IV.4.3. Immunfällung

Cross-Link

20µl Protein-A Sepharose wurden einmal mit 0,2M Triethanolamin (pH 8,2) gewaschen und bei 3000xg für eine Minute zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in Triethanolamin wurde die Sepharose mit 10µl des jeweiligen Antikörpers für eine Stunde inkubiert, bei 100xg für eine Minute zentrifugiert und wieder in Triethanolamin gewaschen. Es folgte 1min Inkubation in 1ml Triethanolamin mit 20mM DMP für eine Stunde. Nach erneuter Zentrifugation bei 100xg erfolgte eine weitere Inkubation in Triethanolamin für eine Stunde. Anschließend folgten drei Waschschrte in IP-Puffer (50mM Tris, pH 7,5; 150mM NaCl) mit einer jeweiligen fünf-minütigen Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 100xg für 1min. Die Sepharose wurde bei 4°C über Nacht in IP-Puffer aufbewahrt und erst kurz vor der weiteren Verwendung bei 100xg für 1min zentrifugiert.

Fällung

Innere Chloroplasten-Hüllmembranen (entsprechend 70µg Protein) aus Erbse wurden durch Ultrazentrifugation bei 256.000xg bei 4°C für 10min pelletiert und anschließend in IP-Puffer, versetzt mit 0,5% Dodecylmaltosid, gelöst und eine Stunde auf Eis inkubiert, alle 10min

gemischt und wieder zentrifugiert (100.000xg, 4°C, 10min). Der Überstand, welcher die gelösten Proteine enthält, wurde 1:10 mit IP-Puffer verdünnt. Die an Sepharose-A gekoppelten Antikörper (s.o.) wurden anschließend in dem verdünnten Überstand aufgenommen. Nach einer Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur folgte zweimaliges Waschen mit IP-Puffer, versetzt mit 0,05% Dodecylmaltosid, und ein dritter Waschschritt mit IP-Puffer für jeweils fünf Minuten. Um die Proteine von den Antikörpern zu lösen wurde die Sepharose in 1x Laemmli-Puffer (ohne β -Mercaptoethanol) aufgenommen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand über eine Micro Bio-SpinTM Chromatographie Säule (Bio-Rad Laboratories, USA) von der Sepharose gereinigt und die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

IV.4.4. Membransolubilisierung

Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbse wurden bei 256.000xg für 10min bei 4°C zentrifugiert, in vier getrennten Ansätzen in 1M NaCl, 0,1M Na₂CO₃ (pH 11,3), 6M Harnstoff oder 1% Triton resuspendiert und für 20min auf Eis (Harnstoff-Ansatz bei RT) inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 100.000xg und 4°C folgte eine Resuspension des Pellets in Laemmli-Puffer. Die Proteine wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern analysiert.

IV.4.5. Proteolyse von Membranvesikeln

Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbse wurden bei 256.000xg pelletiert und in "Pea-WashII"-Puffer (330mM Sorbitol; 50mM Hepes; 0,5mM CaCl₂; pH 7,6) aufgenommen. Nach Zugabe der Proteasen Thermolysin (1µg Enzym/1µg Protein) oder Trypsin (0,1µg Enzym/1µg Protein) wurde der Verdau nach 0, 2, 5 und 15min (Thermolysin) sowie nach 0, 2, 5, 15 und 30min (Trypsin) mit 5mM EDTA (Thermolysin) oder 1mM PMSF, 1µg α -Macroglobulin, 5µg Trypsin Inhibitor je 1µg Protease (Trypsin) gestoppt. Die Proteine wurden anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern analysiert.

IV.4.6. Protein-"PEGylierung"

Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbse wurden bei 256.000xg pelletiert und anschließend in 100mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH7 gelöst. Mit 7,5mM PEGMal (Metroxypolyethylenglycol-Maleimid, 5,000Da, Laysan Bio, Arab, USA) erfolgte eine Inkubation im Dunkeln für 0, 5, 10 und 30min sowie für 30min unter Zugabe von 1% SDS.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4x-Laemmli-Puffer (250mM Tris-HCl, pH6,8; 40% Glycerin; 9% SDS; 20% β -Mercaptoethanol; eine Spatelspitze Bromphenolblau) mit 100mM DTT gestoppt. Anschließend wurden Proteine über eine Bis-Tris-SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern analysiert.

IV.4.7. Immunodetektion von Proteinen

Elektrotransfer von Proteinen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer "Semi-Dry-Blot"-Apparatur (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH, Schweiz) auf Nitrozellulose-Membran (PROTRAN BA83, 0,2 μ m, Whatman/Schleicher & Schüll, Deutschland) oder auf PVDF-Membran (Zefa Transfermembran Immobilon-P, 0,45 μ m, Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland) übertragen. Für den Blotvorgang wurden von der Anode ausgehend drei, mit Anodenpuffer I (300mM Tris; 20% MeOH; pH 10,4) getränkte Whatman-Filterpapiere, zwei, in Anodenpuffer II (30mM Tris; 20% MeOH; pH 10,4) getränkte Whatman-Filterpapiere und dann die in Methanol aktivierte (nur PVDF) und in Anodenpuffer II gewaschene Membran gelegt. Auf die Membran folgte das in Anodenpuffer II inkubierte Gel und anschließend drei in Kathodenpuffer (25mM Tris; 40mM Aminocapronsäure; 20% MeOH; pH 7,6) getränkte Whatman-Filterpapiere. Die Dauer des Transfers betrug etwa 1h bei einer Stromstärke von 0,8mA pro cm² Membranfläche.

Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper

Der spezifische Proteinnachweis erfolgte durch die Bindung von polyklonalen Antikörpern an die Proteine und anschließender Detektion mittels eines enzymgekoppelten Sekundär-Antikörpers (alkalische Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG oder ECL-Peroxidase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG). Die Membranen wurden dreimal 10min in Magermilchpulver-Puffer (1-3% Magermilch; 0,03-0,1% BSA; 100mM Tris-HCl, pH 7,5; 150mM NaCl) inkubiert und mit einer Verdünnung des primären Antikörpers (1:250 - 1:5.000 in TTBS [100mM Tris-HCl, pH7,5; 0,2% Tween 20; 0,1% BSA; 150mM NaCl]) bei RT für 2h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10min in Magermilchpulver-Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (alkalische Phosphatase 1:8.000; ECL-Peroxidase 1:10.000 in TTBS) für 1h inkubiert. Für Detailinformationen siehe Tabelle 4. Nach zwei zehn-minütigen Waschschritten in Magermilchpulver-Puffer wurde für den Nachweis mit der alkalischen Phosphatase die Färbereaktion durch die Zugabe der Färbelösung (100mM Tris-HCl (pH 9,5), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) mit 66 μ l/10ml NBT (4-Nitrotetrazolium-chloridblau, 50mg/ml in 70%

Dimethylformamid) und 133µl/10ml BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, 12,5mg/ml in 100% Dimethylformamid) gestartet. Die Reaktion wurde in 50mM EDTA abgestoppt.

Für den Nachweis durch "enhanced Chemiluminescence" (ECL) wurden die ECL-Lösungen 1 (100mM Tris-HCl, pH 8,5; 1% (w/v) Luminol; 0,44% (w/v) Cumarin Säure) und 2 (100mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,018% (v/v) H₂O₂) im Verhältnis 1:1 gemischt, die Membran benetzt und 1min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lumineszenz-Signal mit einem Film (Kodak Biomax MR, PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) aufgenommen.

IV.4.8. Antiseren

Primäre Antikörper gegen die heterolog in *E.coli* überexprimierten und aufgereinigten Proteine Ps-NiCo (aus Erbse; Aminosäuren 236-375), NAP13 und NAP14 (aus *Arabidopsis*, mature Proteine) wurden in Kaninchen erzeugt (Pineda Antikörperservice, Berlin, Deutschland). Für die Überexpression wurden die Konstrukte Ps-NiCo236-375/pProEx, NAP13/pET21d sowie NAP14/pET21d in *E.coli* BL21 (DE3) Zellen (Novagen/Merck) transformiert und die Kulturen bei 37°C in M9ZB-Medium (100µg/ml) Ampicillin, auf eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 angezogen. Die Induktion der Protein-Überexpression erfolgte durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid) bei 37°C. Nach 3h wurden die Zellen bei 6000xg für 15min bei 4°C pelletiert, in "Resuspention"-Puffer (50mM Tris-HCl, pH 8,0; 200mM NaCl; 5mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen und mit dem Mikrofluidisierer (Newton, USA) pneumatisch aufgeschlossen. Nach einer Behandlung der Suspension mit Ultraschall (dreimal 30 Pulse von je 1sec) folgte eine Zentrifugation bei 20.000xg für 30min bei 4°C. Die pelletierten "Inclusion-Bodies" wurden in "Detergenz"-Puffer (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 200mM NaCl; 1% Desoxycholsäure; 1% Nonidet P-40; 10mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und bei 12.000xg für 10min bei 4°C pelletiert. Es folgten jeweils zwei weitere Resuspensionen in Triton-Puffer (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5% Triton X-100; 5mM β-Mercaptoethanol) und anschließend Tris-Puffer (20mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM DTT) mit zwischenzeitlicher Pelletierung durch Zentrifugation (12.000xg, 10min, 4°C). Der Aufschluss der "Inclusion-Bodys" erfolgte in Puffer G (50mM NAPP, pH 8; 100mM NaCl; 2mM β-Mercaptoethanol und 6M Guanidiniumchlorid). Alle Proteine wurden dann mit Hilfe ihres C-terminalen Polyhistidin-Tag an Ni-NTA-Speharose (GE Healthcare, München) gebunden, mit Puffer A (50mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0; 100mM NaCl; 2mM β-Mercaptoethanol; 8M Harnstoff) gewaschen und anschließend mit 50-500mM Imidazol versetztem Puffer A eluiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Fraktion, welche

das rekombinante Protein enthielt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein aus dem entsprechenden Gelstück in einem Dialyseschlauch bei 24mA über Nacht in SDS-Laufpuffer (25mM Tris, 200mM Glycin, 1% SDS) elektroeluiert. Alle aufgereinigten Proteine wurden zu Pineda Antikörperservice (Berlin) zur Immunisierung von Kaninchen geschickt. Für die Gewinnung primärer Antikörper gegen die zwei NiCo-Isoformen aus *Arabidopsis*, At-NiCo1 und At-NiCo2, wurden ebenfalls von Pineda kurze Peptide (siehe Abbildung 8A, Seite 46) synthetisiert und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete, primäre Antikörper

Antikörper	gerichtet gegen	Blutung Tage / Tier	Verdünnung in TTBS	Puffer
PIC1	Erbse	210 / 1	1:1000	3% Magermilch, 0,1% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
TIC62	Erbse	-	1:1000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
NiCo	Erbse	150 / 1	1:2000	3% Magermilch, 0,1% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
OEP16.1	Erbse		1:10000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
Ps-YGGT	Erbse	150 / 2	1:2000	3% Magermilch, 0,1% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-NiCo1	<i>Arabidopsis</i>	120 / 3	1:1000	3% Magermilch, 0,1% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
At-NiCo2	<i>Arabidopsis</i>	210 / 1	1:1000	3% Magermilch, 0,1% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
LSU	<i>Arabidopsis</i>	-	1:5000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
Lhcb1	<i>Arabidopsis</i>	-	1:5000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
NAP13	<i>Arabidopsis</i>	150 / 1	1:2000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl
NAP14	<i>Arabidopsis</i>	150 / 1	1:2000	1% Magermilch, 0,03% BSA, 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl

IV.4.9. Isolierung von Hüllmembranen aus *Arabidopsis*-Chloroplasten

Chloroplasten aus *Arabidopsis* wurden in Anlehnung an die Methode von Kunst (1998) isoliert. Um vier kontinuierliche Percoll-Gradienten durch Zentrifugation zu erstellen, wurden je 15ml Percoll und 15ml 2x RB-Puffer (600mM Sorbitol; 40mM Tricine/KOH, pH 7,6; 10mM MgCl₂; 5mM EDTA) gemischt und für 55min bei 38.700xg zentrifugiert (SS-34 Rotor; Sorvall). 100-200g frisch geerntetes Blattmaterial drei bis vier Wochen alter Pflanzen wurde in Ho-Puffer (450mM Sorbitol; 20mM Tricine/KOH, pH 8,4; 10mM EDTA; 10mM NaHCO₃; 0,1% BSA; 6ml/1g Blattmaterial) in einem Küchenmixer homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Gaze gefiltert und auf vier bis sechs 250ml-

Zentrifugen-Becher aufgeteilt. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei 1465xg (JA-14 Rotor; Beckmann) und anschließend eine vorsichtige Resuspension des Pellets mit einem Pinsel in 20ml 1x RB-Puffer. Die Chloroplasten-Suspension wurde mit abgeschnittenen Pipettenspitzen auf die Percoll-Gradienten geschichtet und bei 13.300xg zentrifugiert (Ausschwing-Rotor HB-6; Sorvall; verringerte Bremsen). Somit wurden intakte von zerstörten Chloroplasten getrennt. Die intakten Chloroplasten (untere Bande) wurden vorsichtig, mit abgeschnittenen Pipettenspitzen, in 250ml-Zentrifugen-Becher überführt, mit 1x RB-Puffer gewaschen und bei 1465xg für 5min pelletiert. Anschließend wurden die Chloroplasten osmotisch in 15ml "Burst"-Puffer (10mM Hepes; 5mM MgCl₂, pH 7,6) lysiert und basierend auf Li *et al.* (1991) fraktioniert. Je 5ml Chloroplasten-Suspension wurde auf einen Saccharose-Stufengradienten (1,2M, 1,0M und 0,46M Saccharose in "Burst"-Puffer) geschichtet und für 2h bei 58.000xg im Ausschwing-Rotor (Surespin630/36, Thermo Scientific, USA) zentrifugiert. Die gemischten Hüllmembranen (in der Grenzschicht zwischen der 0,46M und 1,0M Saccharose) wurden abgenommen, mit "Burst"-Puffer mindestens 1:3 verdünnt und wiederum für 1h bei 135.200xg im Ausschwing-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in möglichst wenig "Burst"-Puffer (ca. 100µl) aufgenommen und bei -80°C gelagert.

IV.4.10. Isolierung von Hüllmembranen aus Erbsen-Chloroplasten

Die Isolierung von getrennten äußeren und inneren Hüllmembranen aus intakten Chloroplasten von Erbse (*Pisum sativum*) erfolgte standardmäßig nach der Methode von Waegemann *et al.* (1992). Als Ausgangsmaterial dienten Blätter von ca. 10 bis 14 Tage alte Erbsen-Pflanzen, die im Gewächshaus auf Sand kultiviert wurden.

IV.4.11. Metallgehalt-Analyse

Für die Analyse des Metallgehalts wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen ohne Wurzeln geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Metallanalyse wurde mittels Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES, engl.: "inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy") von dem Institut für anorganische Analytik (Helmholtz Zentrum München, Neuherberg) durchgeführt.

V. ERGEBNISSE

V.1. Das Metalltranslocon um PIC1

V.1.1. Identifikation von PIC1 Interaktionspartnern

Das Protein PIC1 wurde als Eisenpermease in der inneren chloroplastidären Hüllmembran beschrieben (Duy *et al.*, 2007). Es wurden Verlust- sowie Überexpressionsmutanten im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* untersucht und eine Funktion von PIC1 bei der Eisenaufnahme über die innere Hüllmembran gezeigt (Duy *et al.*, 2011). Da angenommen wird, dass die Eisenpermease PIC1 der erste identifizierte Teil eines Proteinkomplexes ist, welcher die Funktion des Eisentransports in den Chloroplasten erfüllt, war es Ziel dieser Arbeit, mögliche Interaktionspartner von PIC1 zu finden. In einem ersten Ansatz wurde ein Screening mit Hilfe des Hefe-Split-Ubiquitin-Systems von DUALSystems Biotech AG (Zürich, Schweiz), durchgeführt. Im Vorfeld dieses Screens musste das Protein PIC1 als Köderprotein getestet werden. Gleichzeitig wurde so eine Interaktion von PIC1 mit sich selbst überprüft.

In die Hefezellen des Stammes NMY51 wurde das mature PIC1 Protein (mPIC1) als Köderprotein daher sowohl zusammen mit dem positiven sowie dem negativen Kontrollvektor als auch mit mPIC1 als Beuteprotein transformiert. Jeder Transformationsansatz wurde anschließend zu gleichen Teilen auf Kontrollplatten (SD -L/T Medium, ohne die auxotrophen Marker von Köder- [Leucin] und Beutevektor [Tryptophan]) sowie auf Selektivplatten (SD-L/T/H/A Medium; zusätzlich ohne die auxotrophen Marker für Protein-Interaktion: Histidin und Adenin) ausgebracht. Bei der Doppeltransformation mit dem negativen Kontrollvektor konnte kein Wachstum von Hefekolonien auf den Selektivplatten beobachtet werden (Abbildung 2A). Bei der Transformation von PIC1 zusammen mit der positiven Kontrolle konnte ein deutliches Kolonienwachstum gezeigt und somit die Funktion von PIC1 im Hefe-Split-Ubiquitin-System als Köderprotein bestätigt werden (Abbildung 2B). Desweiteren konnte Kolonienwachstum von 22% (Anzahl Kolonien auf der Selektionsplatte gegenüber der Kolonienanzahl auf der Kontrollplatte) bei der Interaktion von PIC1 mit PIC1 beobachtet werden (Abbildung 2C). Das Ergebnis konnte in drei unabhängigen Ansätzen verifiziert werden.

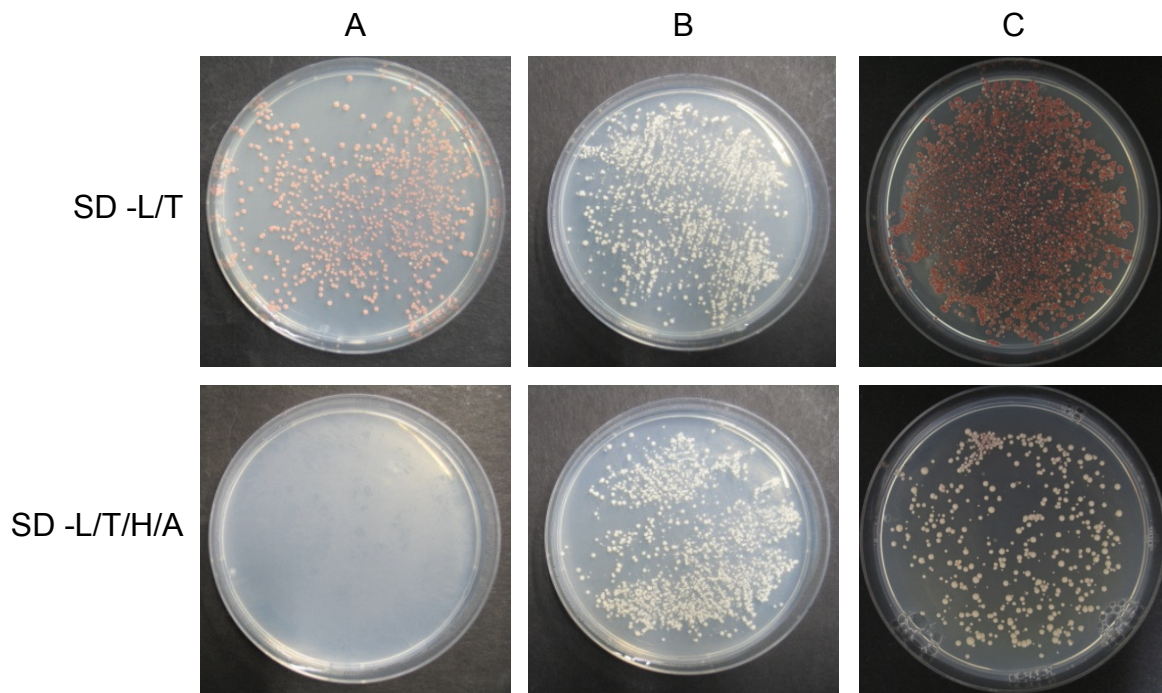


Abbildung 2: Split-Ubiquitin-Test von PIC1

Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit folgenden Konstrukten transformiert: **(A)** mPIC1 X negativer Kontrollvektor; **(B)** mPIC1 X positiver Kontrollvektor; **(C)** mPIC1 X mPIC1. Anschließend wurde der Transformationsansatz zu gleichen Teilen auf Transformations-Kontrollplatten (SD -L/T) sowie auf die Selektivplatten (SD -L/T/H/A) ausgebracht und 72 Stunden bei 30°C inkubiert.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass mPIC1 als Köderprotein im Hefe-Split-Ubiquitin-System funktioniert und somit für einen Screen geeignet ist. Für den Screen wurde eine cDNA-Bibliothek aus isolierter RNA von einem Gemisch aus sechs Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen, angezogen in Blaulicht, Rotlicht und im Dunkeln, verwendet (DUALSystems Biotech AG). Das Ergebnis des Screens waren 97 potentielle Interaktionsproteine von PIC1 (Tabelle im Anhang). Für 37 dieser Proteine wurde ein chloroplastidäres Transitpeptid und damit eine Lokalisation im Chloroplasten vorhergesagt (ChloroP; Emanuelsson *et al.*, 1999). Durch weitere Recherchen nach bereits bekannten Funktionen der Proteine, konnte die Liste der interessantesten Kandidaten auf 9 Proteine eingegrenzt werden (Tabelle 5). Zu dem Protein #63a wurde in der Datenbank ARAMEMNON (Schwacke *et al.*, 2003) ein homologes Protein #63b gefunden und in die Liste aufgenommen. Alle Proteine dieser Liste wurden erneut einzeln und als mature Proteine auf eine Interaktion mit dem Köderprotein mPIC1 im Split-Ubiquitin-System getestet.

Tabelle 5: Potentielle PIC1 Interaktionspartner

Liste der potentiellen PIC1 Interaktionspartner in *Arabidopsis* sortiert nach ihrer Listennummer in der Ursprungsliste des Screen-Ergebnisses (Nr.). Der zugehörige AGI-Code, die Länge des Proteins in Aminosäuren (AS), die Länge des vorhergesagten, chloroplastidären Transitpeptids in Aminosäuren (cTP), die Anzahl der Transmembrandomänen (TMD), die Größe des maturen Proteins in Kilodalton, die Funktion, sowie die prozentuale Kolonienanzahl auf der Selektivplatte im Vergleich zur Kolonienanzahl auf der Kontrollplatte (Interaktion mit PIC1 in %) sind angegeben.

Nr.	AGI-Code	AS	cTP	TMD	mature Größe (in kDa)	Funktion	Interaktion (in %)
2	At1g69910	636	29	1	67,3	rezeptor ähnliche Protein-Kinase	0,5
11	At1g52870	306	41	2	29,9	unbekannte Funktion	10
21	At3g59500	269	36	5	26,4	unbekannte Funktion	9
22	At3g12100	393	47	6	38,5	möglicher Metall-Kationen Transporter	10
23	At2g36100	206	35	4	18,3	unbekannte Funktion	14
31	At4g19980	127	14	-	12,7	unbekannte Funktion	2
32	At4g31510	214	23	-	21,5	unbekannte Funktion	35
59	At4g27540	241	22	2-4	23,6	möglicher GTPase Rezeptor	37
63a	AT4g35080	365	79	6-7	30,1	hochaffiner Nickeltransporter	21
63b	At2g16800	372	78	6-7	31,1	hochaffiner Nickeltransporter	44

Als Grenzwert für eine positive Interaktion wurde ein Kolonienwachstum von mindestens 20% der Kolonienanzahl auf der Selektivplatte im Vergleich zur Kontrollplatte (SD -L/T) angenommen ("DUALmembrane kit 3 user manual", DUALSystems Biotech AG, Zürich, Schweiz). Positive Interaktionen von mPIC1 mit dem maturen, löslichen Protein #32 und den maturen Membranproteinen #59 (Abbildung 3A und 2B) sowie #63a und #63b (Abbildung 3C und D) konnten beobachtet werden.

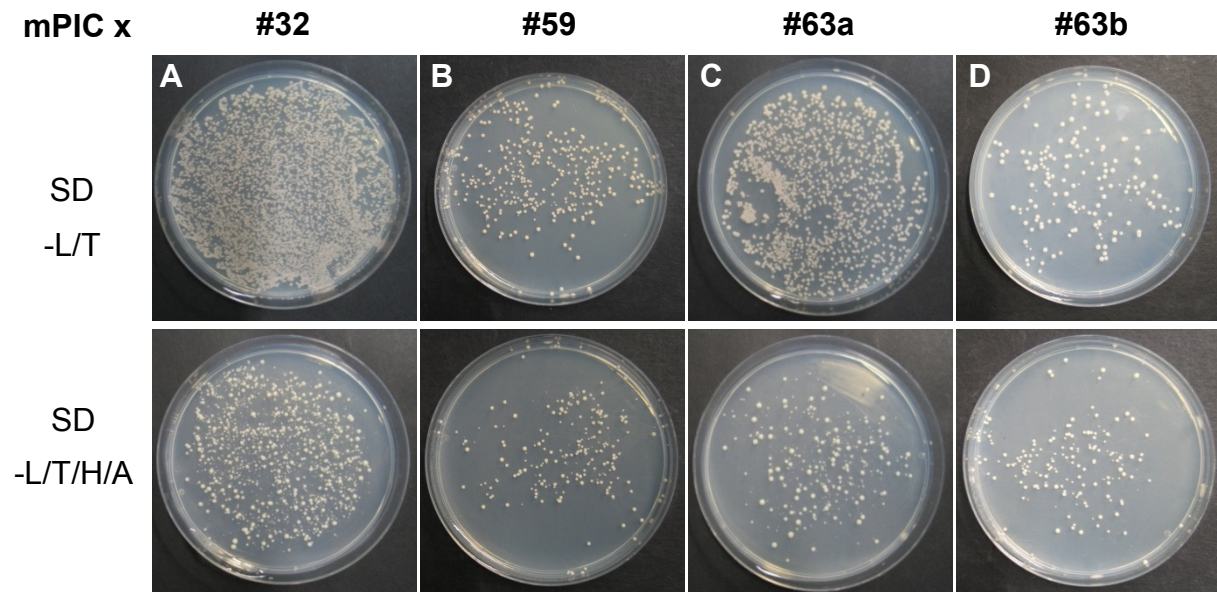


Abbildung 3: Split-Ubiquitin-Test von PIC1 mit potentiellen Interaktionspartnern

Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit folgenden Konstrukten transformiert: **(A)** mPIC1 X #32; **(B)** mPIC1 X #59; **(C)** mPIC1 X #63a; **(D)** mPIC1 X #63b. Anschließend wurde der Transformationsansatz zu gleichen Teilen auf Transformations-Kontrollplatten (SD -L/T) sowie auf die Selektivplatten (SD -L/T/H/A) ausgebracht und 72 Stunden bei 30°C inkubiert.

V.1.2. Homooligomerisierung von PIC1 und Interaktion in Pflanzenzellen

Die Eisenpermease PIC1 bildet die membranständige Domäne eines Eisen/Metall-Transportkomplexes durch die innere Chloroplasten-Hüllmembran. Um dieser Funktion nachkommen zu können, findet in allen vergleichbaren bakteriellen Transportkomplexen eine Homooligomerisierung der membranständigen Domänen statt. Eine Bildung von Homooligomeren von PIC1 wurde zum ersten Mal in einer Blau-Nativen-Gelelektrophorese nachgewiesen (Duy, 2009). In der vorliegenden Arbeit erfolgte ein zweiter Nachweis über das Split-Ubiquitin-System in Hefe (Abbildung 2). Im Folgenden sollte eine Homooligomerisierung von PIC1 *in vivo* in Tabakzellen durch das BiFC-System (engl.: "bimolecular fluorescence complementation"; Gehl *et al.*, 2009) gezeigt werden. Hierzu wurden beide der sich komplementierenden Hälften des grün fluoreszierenden Proteins GFP (engl.: "green

fluorescent protein") an das Vorstufenprotein PIC1 gekoppelt und anschließend in Blätter von Tabakpflanzen transformiert. Nach Inkubation von 72 - 96 Stunden wurden Protoplasten isoliert und die Fluoreszenz mittels eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops detektiert. Bei der Kombination der zwei an PIC1 gekoppelten GFP-Hälften konnte ein punktförmiges GFP-Signal um die Chloroplasten detektiert werden, was die Interaktion von PIC1 mit sich selbst in der Chloroplasten-Hüllmembran *in vivo* bestätigte (Abbildung 4).

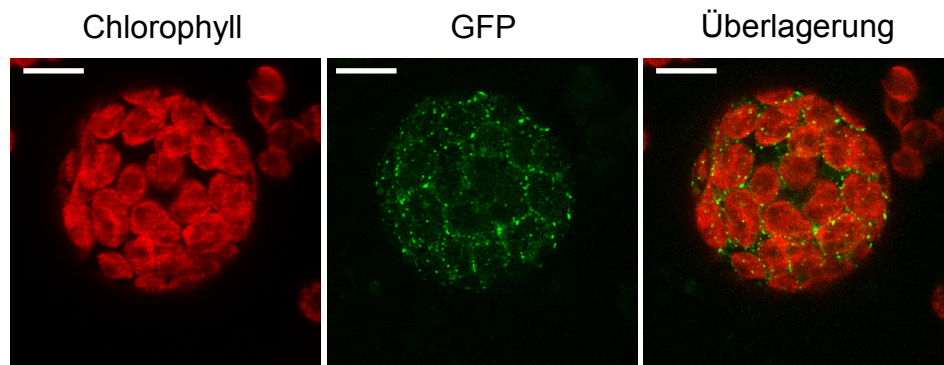


Abbildung 4: PIC1 Oligomerisierung in Tabak-Protoplasten

Blätter von *Nicotiana benthamiana* (Tabak) wurden Agrobakterien vermittelt transformiert. Nach 72 - 96 Stunden Inkubation wurden Protoplasten isoliert und das GFP-Signal mittels eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops detektiert. Als Transformationskonstrukte dienten die zwei komplementären Hälften des GFP-Proteins, C-Terminal gekoppelt mit dem Vorstufenprotein PIC1 (PIC1/pDEST-^{GW}VYNE und PIC1/pDEST-^{GW}SCYCE). Bilder der Chlorophyll-Autofluoreszenz, des GFP-Signals und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Größenstandard entspricht 10µm. GFP: Anregungswellenlänge 488nm, Emmisions-wellenlänge: 509nm; Mikroskop: Leica TCS SP5.

In diesem System sollte auch die Interaktion von PIC1 mit den in Hefe als mögliche Interaktionspartner identifizierten Proteinen in der Pflanzenzelle bestätigt werden. Dafür wurden im Vorfeld die Proteine #63a und #63b über GFP in den chloroplastidären Hüllmembranen lokalisiert (vgl. Abbildung 12, Kapitel V.2.3). Bei der GFP-Lokalisation der Proteine #32 und #59 konnten keine Signale detektiert werden. Aus diesem Grund wurden nur die Proteine #63a und #63b mit einer der beiden komplementären GFP-Hälften des BiFC-Systems fusioniert (#63a/pDEST-^{GW}VYNE, #63b/pDEST-^{GW}VYNE). In dem Interaktionsansatz mit PIC1, fusioniert mit der anderen komplementären GFP-Hälfte (PIC1/pDEST-^{GW}SCYCE) konnte kein GFP-Signal detektiert werden. Auch mit den Fusionskonstrukten PIC1/pDEST-^{GW}VYNE und #63a oder #63b/pDEST-^{GW}SCYCE konnte keine Interaktion gezeigt werden.

V.1.3. Die TonB-Box-Domäne von PIC1

Die Interaktion von PIC1 mit sich selbst, sowie mit anderen Proteinen wurde in den vorherigen Kapiteln beschrieben. Im Folgenden sollte eine am N-Terminus annotierte TonB-Box-Domäne des PIC1-Proteins (Aminosäure 1 - 58 des maturen Proteins) untersucht werden. In mehreren bakteriellen Transporter-Systemen, z.B. dem Eisenzitrat-Transporter aus *E. coli* (FecA) wird der TonB-Box-Domäne eine Funktion in der Interaktion mit dem TonB-Protein, und der damit zusammenhängenden Regulation des Eisenzitrat-Transports, zugeschrieben (Ogierman und Braun, 2003). Zum Nachweis einer möglichen Funktion in der Proteininteraktion wurde die TonB-Box-Domäne von PIC1 in dem Split-Ubiquitin-System näher untersucht. Das mature Protein PIC1 wurde ohne die TonB-Box-Domäne (mPIC1ΔTonB, fehlende Aminosäuren 1-58) als Köderprotein subkloniert. Durch eine Transformation mit den Kontrollvektoren in die Hefezellen des Stammes NMY51 konnte dessen Funktionalität in dem Split-Ubiquitin-System nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Interaktion von mPIC1ΔTonB als Köderprotein mit mPIC1, sowie mit dem potentiellen Partnern #63a und #63b als Beuteprotein untersucht.

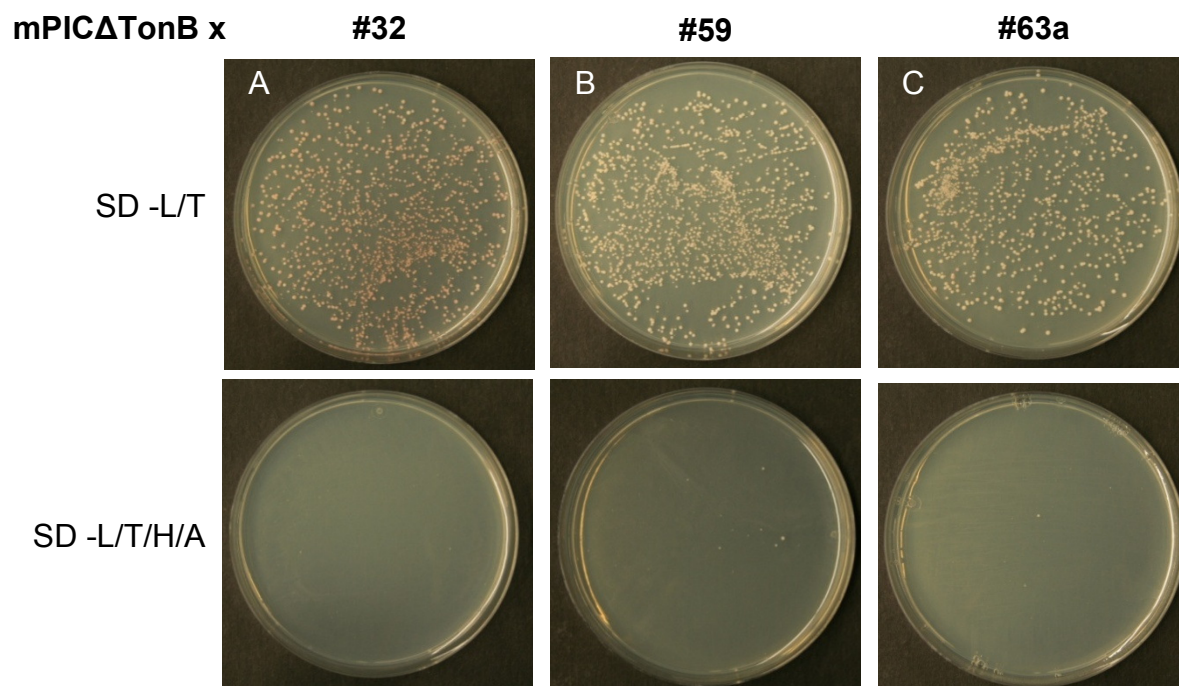


Abbildung 5: Split-Ubiquitin-Test von mPIC1ΔTonB mit PIC1, #63a und #63b

Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit folgenden Konstrukten transformiert **(A)** mPIC1ΔTonB X #63a; **(B)** mPIC1ΔTonB X #63b; **(C)** mPIC1ΔTonB X mPIC1. Anschließend wurde der Transformationsansatz zu gleichen Teilen auf Transformations-Kontrollplatten (SD -L/T) sowie auf die Selektivplatten (SD -L/T/H/A) ausgebracht und 72 Stunden bei 30°C inkubiert.

Es konnte kein Kolonienwachstum auf den Selektivplatten (SD -L/T/H/A) beobachtet werden (Abbildung 5). Dies zeigt auf, dass die Interaktion von PIC1 mit sich selbst bzw. mit anderen Proteinen ohne die TonB-Box-Domäne nicht stattfindet.

Die TonB-Box-Domäne von Proteinen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ist durch eine, in allen Proteinen konservierte, charakteristische Aminosäureabfolge (sauer - Threonin - hydrophob - hydrophob - Valin - polar - Alanin; Buchanan *et al.*, 1999) gekennzeichnet. In den TonB-Box-Proteinen FuhA (Schoffler und Braun, 1989) oder btuB (Bell *et al.*, 1990) wurde die konservierte TonB-Box-Domäne durch Mutationen einzelner Aminosäuren untersucht, und in einigen Fällen ein Funktionalitätsverlust festgestellt. Im Folgenden sollte daher die Aminosäureabfolge L/V/S/T/V/V/A der TonB-Box-Domäne von PIC1, welche dem Motiv der bakteriellen Transportern ähnlich ist, untersucht werden. Hierzu wurde die, in diesem Motiv stark konservierte Aminosäure Valin, an der Position 43 (PIC1-V43P) und 44 (PIC1-V44P), durch die Aminosäure Prolin ausgetauscht. Eine analoge Mutation ist für den Funktionalitätsverlust der TonB-Box des Protein ButB aus *E.coli* beschrieben (Gudmundsdottir *et al.*, 1989). Die Funktionalität der Konstrukte mPIC1-V43P und mPIC1-V44P in dem Split-Ubiquitin-System wurde durch Transformation mit den Kontrollvektoren nachgewiesen.

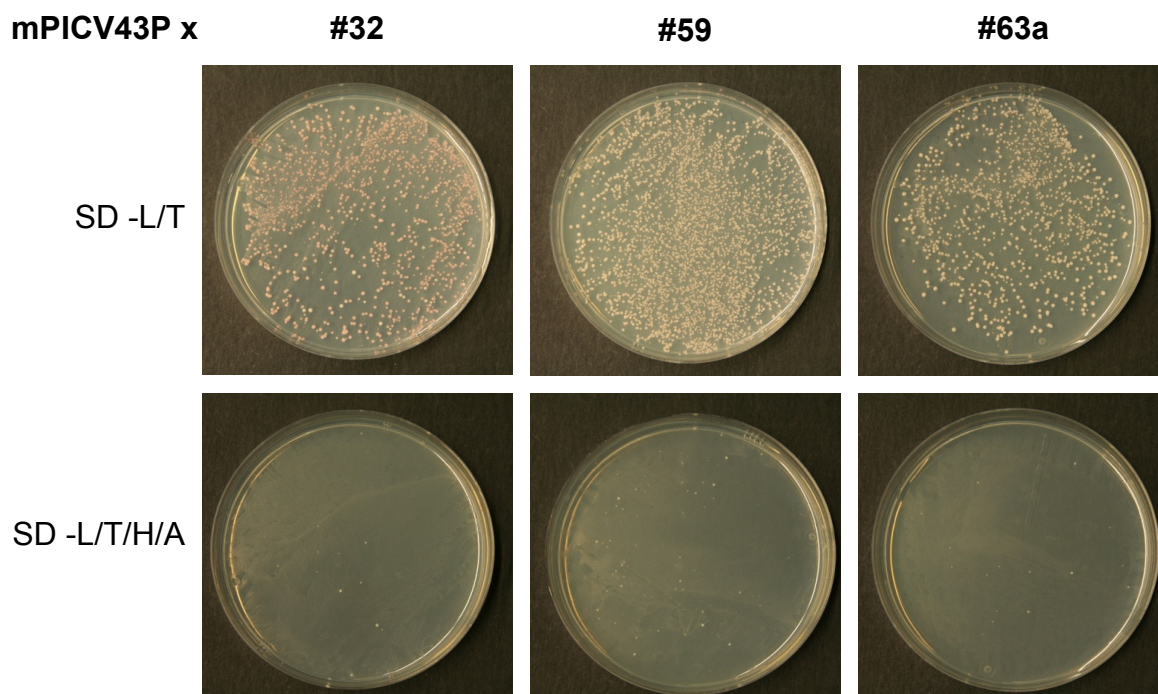


Abbildung 6: Split-Ubiquitin-Test von mPIC1V43P und mPIC1V44P

Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit folgenden Konstrukten transformiert **(A)** mPIC1V43P X #63a; **(B)** mPIC1V43P X #63b; **(C)** mPIC1V43P X mPIC1. Anschließend wurde der Transformationsansatz zu gleichen Teilen auf Transformations-Kontrollplatten (SD -L/T) sowie auf die Selektivplatten (SD -L/T/H/A) ausgebracht und 72 Stunden bei 30°C inkubiert.

Mit dem Konstrukt mPIC1-V44P als Köder konnte im folgenden Interaktionstest mit mPIC1, #63a sowie #63b als Beuteproteine keine Beeinflussung der Interaktionsstärke festgestellt werden. Allerdings konnte mit dem Konstrukt mPIC1-V43P als Köder ein Verlust der Interaktionsfähigkeit, durch ausbleibendes Kolonienwachstum auf den Selektivplatten, gezeigt werden (Abbildung 6). Somit wurde die essentielle Bedeutung des Valins an der Position 43 für die Funktionalität der TonB-Box von PIC1 in der Proteininteraktion nachgewiesen.

V.1.4. Die Membranorientierung von PIC1

In einem vorhergesagten Strukturmodell (ARAMEMNON, Schwacke *et al.*, 2003) weist PIC1 vier Transmembranhelices auf wobei die Orientierung von C- sowie N-Terminus in den Intermembranraum oder in das Stroma des Chloroplasten noch nicht geklärt war. Somit sollte die Orientierung von PIC1 in der inneren Hüllmembran durch Proteolyse festgestellt werden. Der proteolytische Verdau von Vesikeln der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus *Pisum sativum* (Erbse) wurde mit der Protease Thermolysin durchgeführt. Die Protease kann unter kontrollierten Bedingungen die Membranen nicht durchdringen, was ausschließlich zu einer Proteolyse der nach außen orientierten Proteinsegmente führt. Die entstandenen Proteinfragmente wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem spezifischen Antikörper gegen PIC1 immunodetektiert. In der unbehandelten Fraktion konnte das mature Protein PIC1 bei einer erwarteten Größe von 22kDa nachgewiesen werden (Abbildung 7A). In den Fraktionen nach 10, 30 und 60 minütiger Inkubation mit Thermolysin wurde ein PIC1-Proteinfragment mit einer Größe von etwa 18kDa detektiert. Ein weiteres, etwa 21kDa großes Proteinfragment, welches nach 10 und 30 Minuten Inkubation detektiert wurde, kann mit der alleinigen Abspaltung des etwa 1,5kDa großen, löslichen C-Terminus von PIC1 erklärt werden. Der Abbau des C- und des N-Terminus führt zu dem erwarteten Proteinfragment von etwa 18kDa. Für eine Bestätigung der Größe der PIC1-Proteinfragmente, und somit einer besseren Abschätzung der Größe der prozessierten C- und N-Termini, wurden Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran nach 0 sowie nach 60 minütiger Inkubation mit Thermolysin über eine höher auflösende SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 7B). Hierbei konnte ein Größenverlust von PIC1 um etwa 4kDa bestätigt werden. Als Kontrollprotein wurde TIC62 verwendet, welches sich innerhalb der Membranvesikel befindet und dadurch unempfindlich gegen eine Proteolyse mit Thermolysin ist. Die Insensitivität von TIC62 gegenüber der Protease Thermolysin zeigt auf, dass die Vesikel die richtige "right-side-out"

Orientierung (Keegstra und Youssif, 1986) haben. Somit kann von einer Orientierung des N- sowie des C-Terminus von PIC1 in den Intermembranraum ausgegangen werden.

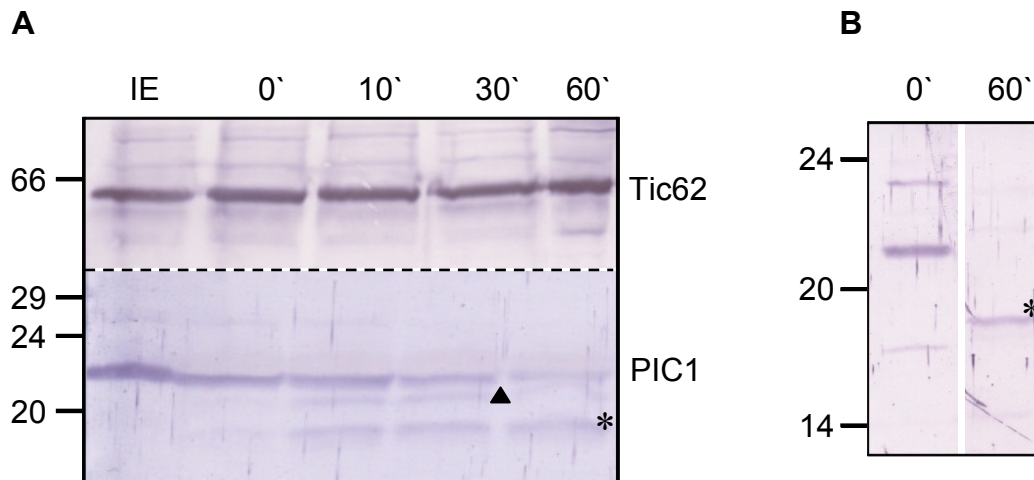


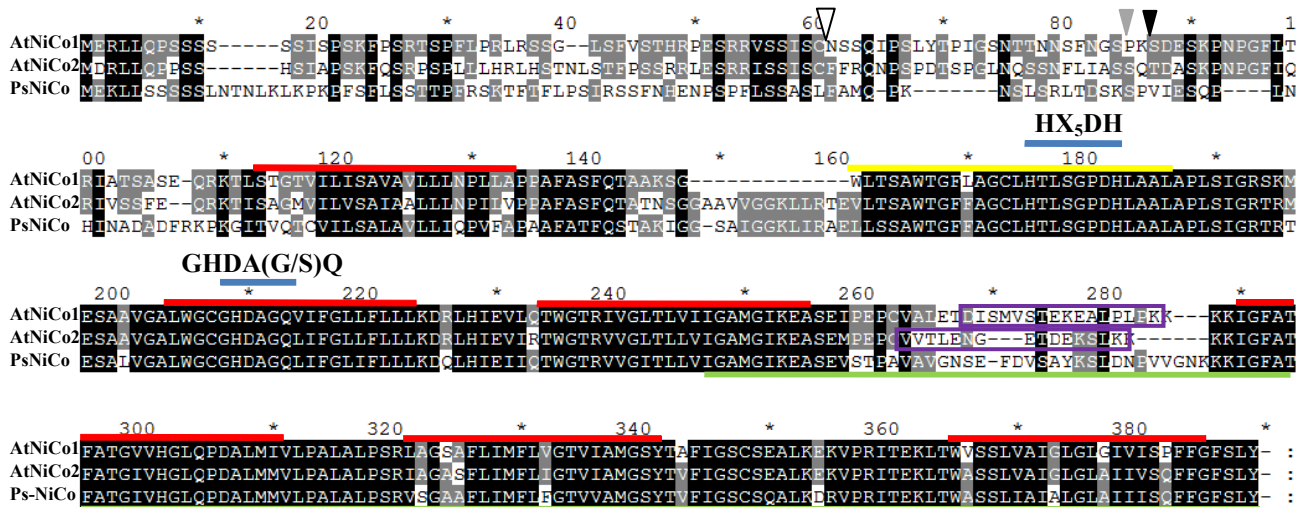
Abbildung 7: Proteolytischer Verdau von PIC1

(A) Gleiche Mengen (entsprechend 10µg Protein) isolierter Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbsen-Pflanzen wurden mit Thermolysin (0,1µg/1µg Protein) inkubiert, nach 0, 10, 30 und 60 Minuten mit dem Thermolysin-Inhibitor EDTA abgestoppt, anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem spezifisch gegen PIC1 gerichteten Antikörper immunodetektiert. Dreieck und Stern markieren die Proteinfragmente von PIC1 bei ca. 21 bzw. 18kDa. Antiserum gegen Tic62 wurde als Kontrolle verwendet. Unbehandelte Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran sind aufgetragen (IE). Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben. **(B)** Höher auflösende Auftrennung der Proteinfragmente des proteolytischen Verdaus nach 0 und 60 Minuten aus.

V.2. NiCo-Proteine aus *Arabidopsis* und Erbse

Aufgrund der Klassifizierung der potentiellen Interaktionspartner von PIC1 (Proteine #63a und #63b, siehe Tabelle 5) in die Ni^{2+} - Co^{2+} -Transporter (NiCoT)-Familie (Familie 2.A.52 der "Transporter Classification Database" [TCDB]; Saier *et al.*, 2009) wurde die Nomenklatur der Proteine #63a und #63b auf NiCo1 sowie NiCo2 geändert. Für Proteine dieser Familie, z.B. HoxN aus dem gram-negativen Bodenbakterium *Ralstonia eutropha* (Degen und Eitinger, 2002) oder NixA aus dem gram-negativem Stäbchenbakterium *Helicobacter pylori* (Wolfram und Bauerfeind, 2002), wurden Funktionen in Nickel-Bindung und -Transport nachgewiesen und in dieser Funktion spezifische HX_4DH -Domänen (Eitinger *et al.*, 1997) der Proteine identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei *Arabidopsis* Isoformen At-NiCo1 und At-NiCo2 sowie das Ortholog Ps-NiCo aus *Pisum sativum* (Erbse) auf die mögliche Zugehörigkeit der NiCo-Proteine zu einem chloroplastidären Eisen- bzw. Metalltranslocon untersucht (Abbildung 8). Die Vorstufenproteine At-NiCo1 (At4g35080) und At-NiCo2 (At2g16800) haben eine Länge von 365 bzw. 372 Aminosäuren (ARAMEMNON; Schwacke *et al.*, 2003) und besitzen ein vorhergesagtes, 79 bzw. 78 Aminosäuren langes chloroplastidäres Transitpeptid (ChloroP; Emanuelsson *et al.*, 1999). In Ihrer maturen Form weisen die Proteine aus *Arabidopsis* somit eine Größe von 30,1kDa bzw. 31,1kDa auf. Die codierende cDNA-Sequenz beider Proteine wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotid-Primern (NiCo1/2_XhoI_fw; NiCo1/2_BamHI_rev) auf cDNA aus *Arabidopsis*-Keimlingen gewonnen. Die Primer wurden auf Basis der in ARAMEMNON annotierten cDNA-Sequenz generiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert und bestätigten die in NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) annotierten RNA-Moleküle NM_119674.4 (At-NiCo1, 5'UTR: 50 Bp, 3'UTR: 309 Bp) und NM_127232.3 (At-NiCo2, 5'UTR: 88 Bp, 3'UTR: 158 Bp) Das orthologe NiCo-Protein aus Erbse (Ps-NiCo) besitzt als Vorstufenprotein eine Länge von 376 Aminosäuren und ein 61 Aminosäure langes, vorhergesagtes chloroplastidäres Transitpeptid. Das mature Protein hat damit eine Länge von 315 Aminosäuren und eine Größe von 33,1kDa. Die codierende Sequenz des Erbsenproteins wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotid-Primern Ps-NiCo_XhoI_fw/Ps-NiCo_BamHI_rev+st gewonnen, welche auf Basis einer EST (engl.: "expressed sequence tag") Datenbank aus Erbse (Franssen *et al.*, 2011) generiert wurden. Die PCR wurde auf cDNA aus Erbsenkeimlingen durchgeführt.

A



B

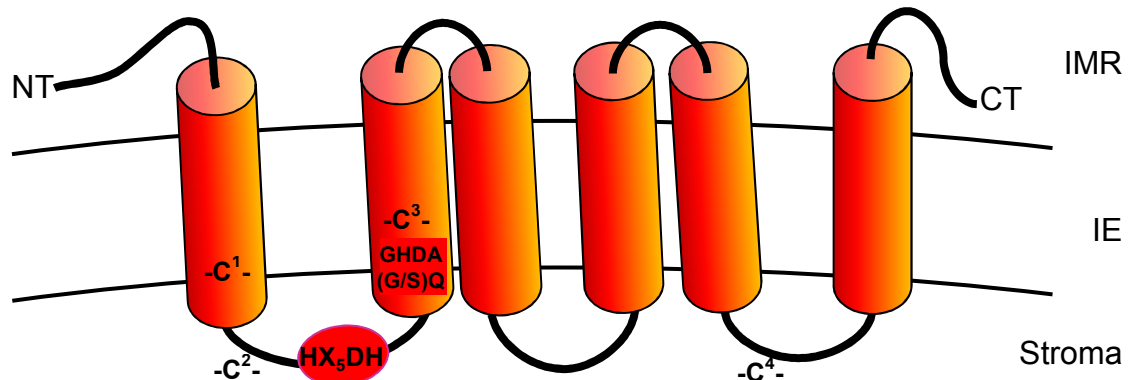


Abbildung 8: Aminosäurevergleich und Strukturmodell von NiCo-Proteinen

(A) Aminosäurevergleich der NiCo-Proteine aus *Arabidopsis* (At-NiCo1 und At-NiCo2) und *Pisum sativum* (Ps-NiCo). Die Prozessierungsstelle des vorhergesagten, chloroplastidären Transitpeptids wird durch ein schwarzes (At-NiCo1), ein graues (At-NiCo2) sowie ein weißes (Ps-NiCo) Dreieck markiert. Die sieben konservierten Transmembrandomänen sind mit roten (TMD Score > 0,8) oder mit gelben (0,4 < TMD Score < 0,8) Balken markiert (ARAMEMNON, Schwacke *et al.*, 2003). Die Peptidsequenzen zur Antikörpergewinnung gegen At-NiCo1 und At-NiCo2 sind lila umrandet. Das Fragment des Ps-NiCo-Proteins, welches für die Antikörpergewinnung von α -Ps-NiCo-CT überexprimiert wurde, ist mit einem grünen Balken markiert. Die zwei Domänen HX₅DH sowie GHDA(G/S)Q sind mit blauen Balken eingetragen. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. **(B)** Strukturmodell der pflanzlichen NiCo-Proteine. Die sechs Transmembrandomänen (TMD Score > 0,8) sind mit hellroten Zylindern dargestellt, die HX₅DH- sowie GHDA(D/S)Q-Domäne rot markiert. CT: C-Terminus; NT: N-Terminus; IMR: Intermembranraum; IE: innere Chloroplasten-Hüllmembran. Ergebnisse zur Orientierung und Lokalisation von NiCo (siehe V.2.4 und V.2.5) sind in das Model bereits integriert. Für die "PEGylierung" (siehe V.2.5) wichtige Cysteine sind eingetragen.

In einem Aminosäurevergleich (Abbildung 8A) weisen die Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 eine Übereinstimmung von 69,6% auf. Das Erbsenprotein Ps-NiCo weist zu den *Arabidopsis*-Proteinen At-NiCo1 56,5% sowie zu At-NiCo2 59,2% identische Aminosäuren auf. Für alle drei Proteine werden sechs bis sieben hydrophobe α -helicale Transmembranhelices vorhergesagt (ARAMEMNON, Schwacke *et al.*, 2003). Eine in allen pflanzlichen, NiCo-homologen Proteinen konservierte HX₃DH-Domäne konnte zwischen der ersten und der zweiten Helix lokalisiert werden (Abbildung 8). In Bakterien ist diese als HX₄DH-Domäne mit einer Nickel-Bindefunktion beschrieben (Eitinger *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Domäne erfolgte die Eingliederung der pflanzlichen NiCo-Proteine in die NiCoT-Familie. Eine als Aktivitätsdomäne beschriebene GHDA(G/S)Q-Aminosäureabfolge (Eitinger *et al.*, 2005) wurde in der zweiten Transmembranhelix gefunden (Abbildung 8).

V.2.1. Die NiCoT-Familie

Über eine BLAST-Suche in der Datenbank "GenBank" (Altschul *et al.*, 1997) wurde mit Hilfe des Programms "Clustal/Vector NTI" (Invitrogen) ein phylogenetischer Vergleich aller Proteine der NiCoT-Familie erstellt (Abbildung 9). Neben den zwei Proteinen aus *Arabidopsis* (At-NiCo1 und At-NiCo2) konnten in mehreren Pflanzen-, Algen- und Bakterien-Spezies sowie in spezialisierten marinen Bakterien weitere orthologe Proteine gefunden werden. Bei einigen Bakterienspezies handelt es sich um in Ihrer Funktion bereits beschriebene Proteine aus der NiCoT-Familie. Als Beispiel können die NiCoT-Proteine NixA aus *Helicobacter pylori*, welchem eine wichtige Funktion in der Ni²⁺-Bindung nachgewiesen wurde (Wolfram und Bauerfeind, 2002), oder das Protein RcnA aus *E.coli*, welches eine Funktion in Ca²⁺ und Ni²⁺ Export haben könnte (Rodrigue *et al.*, 2005), aufgeführt werden. Das orthologe Protein aus *Schizosaccharomyces pombe* wird der Gruppe der Proteine aus Bakterien zugeordnet. In Cyanobakterien wurde ein NiCoT-Protein nur in den marinen Spezies *Synechococcus* und *Prochlorococcus marinus* gefunden. Auch mehrere Grün- und Braunalgen sowie manche Pilze besitzen Proteine der NiCoT-Familie. In dem Moos *Physcomitrella patens*, sowie in den höheren Pflanzen Mais, Wunderbaum, Weinrebe, Sojabohne, Erbse und Tabak wurde jeweils ein Gen, in Reis, Hirse, *Arabidopsis*, Pappel und Wein hingegen wurden jeweils zwei NiCo-Gene identifiziert.

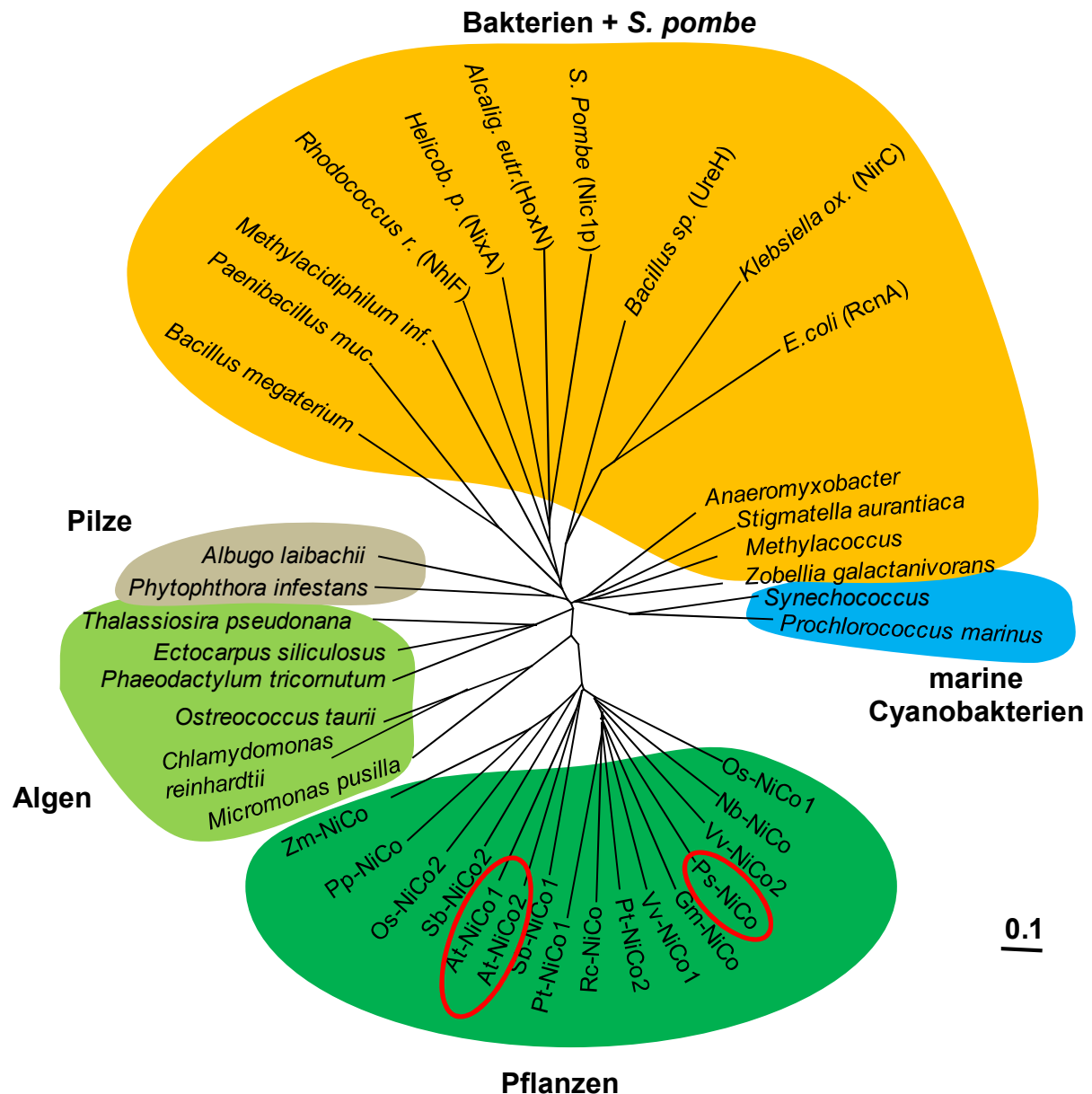


Abbildung 9: Phylogenie der NiCoT-Familie

Alle Proteine wurden über eine BLAST-Suche, basierend auf der maturen Sequenz von At-NiCo1, in der Datenbank "GenBank" (Altschul et al., 1997) identifiziert und mit "Clustal/Vector NTI" (Invitrogen) ausgewertet. Im Pflanzenreich konnten ein oder zwei orthologe Proteine in vielen Spezies gefunden werden. Zm: Mais (*Zea mays*); Pp: Kleines Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*); Os: Reis (*Oryza sativa*); Sb: Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*); At: *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*); Pt: Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*); Rc: Wunderbaum (*Ricinus communis*); Vv: Weinrebe (*Vitis vinifera*); Gm: Sojabohne (*Glycine max*); Nb: Tabak (*Nicotiana benthamiana*). Außerdem konnten in vielen Bakterienspezies, Algen sowie in einigen marinen Bakterien sowie Pilzen und in *S. pombe* orthologe Proteine gefunden werden. Die NiCo-Proteine aus *Arabidopsis* sowie aus Erbse sind markiert (rote Kreise).

V.2.2. Gewinnung von rekombinanten NiCo-Proteinen

Zur Gewinnung von Antikörpern sollten die NiCo-Proteine aus *Arabidopsis* und Erbse rekombinant in Bakterien überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Zunächst wurde versucht die maturen *Arabidopsis*-Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 in voller Länge, sowie in einer am C-Terminus verkürzten Form, durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induzierte Überexpression im *E.coli*-Bakterienstamm BL21 zu gewinnen. Als Überexpressionsvektoren wurden pET21d sowie pPROex verwendet. Bei dem Überexpressionsansatz mit dem verkürzten At-NiCo1-Fragment in pPROex, konnte in einem Coomassie gefärbten Gel eine Proteinanreicherung in den Zelllysaten zwei bzw. drei Stunden nach der Induktion nachgewiesen werden. Die bei ca. 22kDa auftretende Proteinbande (Abbildung 10) wurde im "Zentrallabor für Proteinanalytik" (AG Prof. Imhof, LMU München) durch Massenspektrometrie ("Peptide Mass Fingerprint"; MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) sequenziert.

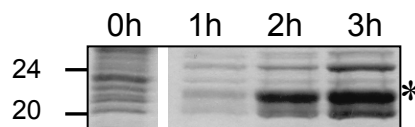


Abbildung 10: NiCo-induzierte FurA Überexpression in *E.coli*

Aufgetragen sind die Zelllysate vor (0h) bzw. eine (1h), zwei (2h) und drei (3h) Stunden nach der IPTG-vermittelten Induzierung der Expression des C-terminal verkürzten At-NiCo1 Konstruktes. Die Bande des angereicherten, FurA Proteins ist durch einen Stern markiert. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Das Ergebnis war die Identifizierung eines Eisenaufnahme regulierenden *E. coli*-Proteins FurA (engl.: "ferric uptake regulator"; Masse *et al.*, 2007). FurA-Proteine haben eine beschriebene, eisenabhängige, meist regulierende Funktion (Gonzalez *et al.*, 2011; Lopez-Gomollon *et al.*, 2007), was auf eisenabhängigen Stress der Bakterien durch die NiCo-Überexpression schließen lässt. In allen weiteren Überexpressionsansätzen konnten keine Fragmente der NiCo-Proteine in den aufkommenden Proteinbanden nachgewiesen werden. Als nächstes wurden mit sechs weiteren Fragmenten der Proteine At-NiCo1 und Ps-NiCo (F1 bis F6; Tabelle 6) Überexpressionen angesetzt (verwendeter Vektor: pPROex, *E. coli* BL21 Zellen).

Tabelle 6: Proteinfragmente zur Überexpression von NiCo

Aufgelistet sind die zur Überexpression verwendeten Fragmente des jeweiligen NiCo-Proteins, die eingrenzenden Aminosäuren (ausgehend vom Vorstufenprotein) sowie die Größe des Fragments in Kilodalton (kDa).

Fragment	Protein	Aminosäuren	erwartete Fragmentgröße (in kDa)	
F1	At-NiCo1	1 bis 140	18	
F2	At-NiCo1	80 bis 140	9,7	
F3	At-NiCo1	229 bis 366	17,7	
F4	Ps-NiCo	1 bis 148	19,1	
F5	Ps-NiCo	63 bis 148	12,5	
F6	Ps-NiCo	236 bis 376	17,8	für Antiserum α -Ps-NiCo-CT

Drei Stunden nach der Induktion der Expression durch IPTG wurden die Proteine des Zelllysats über ein SDS-Proteingel aufgetrennt und dieses mit Coomassie gefärbt. Im Vergleich der Zelllysate vor und nach der Induktion der Expression konnte für das Fragment F6 eine Proteinanreicherung durch eine bei ca. 18kDa auftretende Proteinbande beobachtet werden (Abbildung 10). Eine zweite auftretende Bande bei ca. 14-15kDa lässt sich durch ein weiteres Methionin an Position 273 des NiCo-Proteins erklären, welches als zweiter Expressionsstart gedient haben könnte.

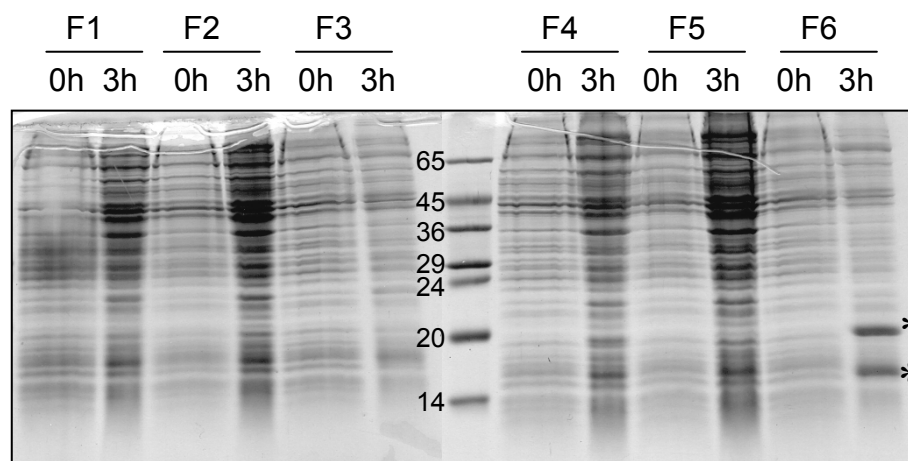


Abbildung 11: Überexpression von NiCo-Fragmenten in BL21 Zellen

Aufgetragen sind die Zelllysate vor (0h) bzw. drei Stunden (3h) nach der IPTG-vermittelten Induzierung der Expression der NiCo-Protein-Fragmente F1-F6 in *E. coli* Zellen des Überexpressionsstammes BL21. Zwei Banden einer Proteinanreicherung sind markiert (Stern; F6; 3h). Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Die in beiden Proteinbanden befindlichen Proteine wurden durch Proteinsequenzierung als Fragmente des Proteins Ps-NiCo bestätigt (Zentrallabor für Proteinanalytik, LMU München) und konnten zur Antikörpergewinnung (α -Ps-NiCo-CT) in Kaninchen verwendet werden. Für die Gewinnung von Antikörpern gegen die *Arabidopsis* Isoformen At-NiCo1 und At-NiCo2 wurden kurze Peptide (At-NiCo1: AS 247-262; At-NiCo2: AS 255-269) der beiden Proteine (siehe Abbildung 8A) synthetisiert und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die Synthese der Peptide sowie die Immunisierung der Kaninchen wurde von der Firma Pineda Antikörperservice (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

V.2.3. Subzelluläre Lokalisation von At-NiCo1 und At-NiCo2

Die subzelluläre Lokalisation der Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 wurde im Folgenden mit Hilfe des grün fluoreszierenden Reporter-Proteins GFP unter *in vivo* Bedingungen untersucht. Beide *Arabidopsis* NiCo-Proteine wurden als Vorstufenprotein verwendet und das GFP-Protein an den jeweiligen C-Terminus der Proteine fusioniert. Die Lokalisation wurde anschließend mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert.

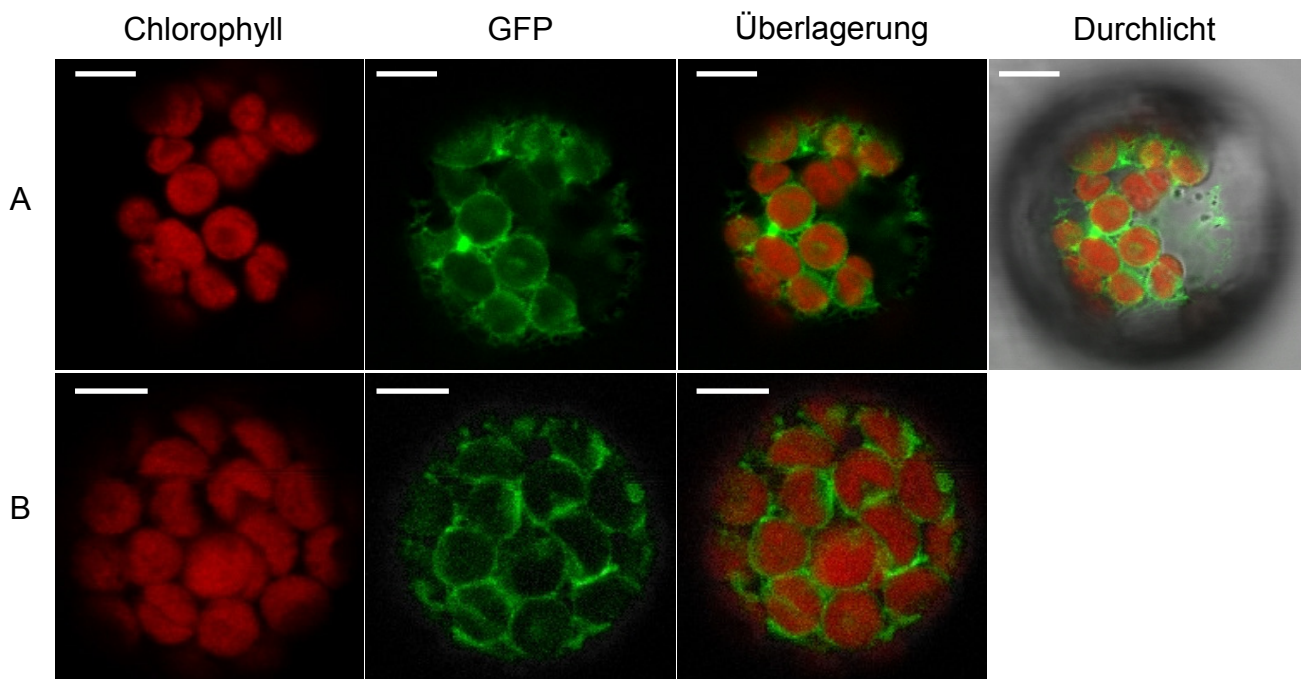


Abbildung 12: Subzelluläre Lokalisierung von At-NiCo1 und At-NiCo2

(A) Isolierte *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten wurden transient mit dem C-terminalen GFP-Fusionskonstrukt des Vorstufenproteins At-NiCo1 transformiert. **(B)** Das Konstrukt At-NiCo2-GFP wurde durch Agrobakterien in *Nicotiana benthamiana* (Tabak) transformiert und anschließend Protoplasten isoliert. Bilder der Chlorophyll-Autofluoreszenz, des GFP-Signals und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Größenstandard entspricht 5 μ m. GFP: Anregungswellenlänge 488nm, Emmisionswellenlänge: 509nm; Mikroskop: Leica TCS SP5.

Für die Lokalisation von At-NiCo1 wurde eine Transformation von *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten, für die Lokalisation At-NiCo2 wurde hingegen eine durch Agrobakterien vermittelte Transformation von Mesophyll-Protoplasten aus *Nicotiana benthamiana* (Tabak) genutzt. Bei At-NiCo1 und At-NiCo2 konnte eine ringförmige Verteilung des GFP-Signals um die Chloroplasten herum beobachtet werden, was auf eine Lokalisation in der Chloroplasten-Hüllmembran schließen lässt (Abbildung 12). Allerdings konnte keine Aussage über die Lokalisierung in der äußeren oder inneren Chloroplasten-Hüllmembran getroffen werden. Die Lokalisation von NiCo aus Erbse wurde mit Hilfe von Fraktionen der inneren sowie der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran, des Stromas sowie der Thylakoidmembranen aus isolierten Erbsenchloroplasten durch Immunoblotanalyse untersucht. Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurden diese mit dem gegen das Protein Ps-NiCo spezifischen Antikörper (α -Ps-NiCo-CT) immunodetektiert. Das Protein Ps-NiCo konnte in der Fraktion der inneren Chloroplasten-Hüllmembran auf einer Höhe von ca. 28kDa detektiert werden (Abbildung 13A). Als Kontrollen wurden Antiseren gegen die Markerproteine LSU (große Untereinheit der RuBisCO im Stroma), LHC (Lichtsammelkomplex der Thylakoidmembran) sowie OEP16.1 (Protein der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran) verwendet.

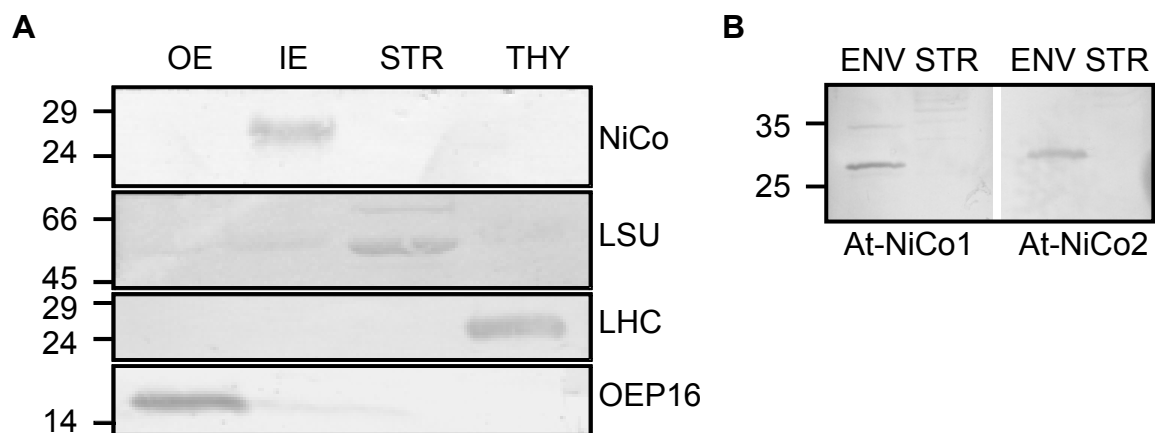


Abbildung 13: Immunoblotanalyse von NiCo in fraktionierten Chloroplasten aus *Arabidopsis* und Erbse

Es wurden Chloroplasten von Erbsen (A) und vier Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen (B) in äußere (OE) und innere Hüllmembran (IE), Stroma (STR) sowie Thylakoidmembran (THY) bzw. gemischte Hüllmembranen (ENV) fraktioniert und anschließend gleiche Proteinmengen (10µg) aller Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunodetektion von NiCo erfolgte mit einem Antikörper gegen den C-Terminus des NiCo-Proteins aus Erbse (α -Ps-NiCo-CT). Die Immunodetektion von At-NiCo1 und At-NiCo2 erfolgte mit den entsprechenden Peptidantikörpern. Antiseren gegen die Markerproteine LSU (Stroma), LHC (Thylakoidmembran) und OEP16 (äußere Hüllmembran) wurden als Kontrollen verwendet. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Für die Lokalisation der zwei Isoformen At-NiCo1 und At-NiCo2 aus *Arabidopsis* wurden Fraktionen gemischter Chloroplasten-Hüllmembran aus *Arabidopsis* sowie des Stromas über SDS-Page aufgetrennt und mit den spezifisch gegen At-NiCo1 sowie At-NiCo2 gerichteten Antikörpern immunodetektiert. At-NiCo1 konnte bei ca. 30kDa und At-NiCo2 bei ca. 31kDa in der Fraktion der gemischten Chloroplasten-Hüllmembranen lokalisiert werden (Abbildung 13B).

V.2.4. Membranintegration von NiCo

Um die Membranintegration, d.h. die Stabilität der Einbettung des Proteins Ps-NiCo in die Membran zu untersuchen, wurden Fraktionen von Vesikeln der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbsenchloroplasten mit einem Hochsalzpuffer (1M NaCl), einem Puffer mit hohem pH-Wert (Na_2CO_3 , pH 11,3), Harnstoff (8M) und Detergenz (Triton 1%) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden durch Zentrifugation die durch die Behandlung gelösten und die weiterhin in der Hüllmembran verankerten Proteine in Überstand (Ü) und Pellet (P) separiert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 14). Anschließend wurde das Protein Ps-NiCo mit dem spezifischen Antikörper α -Ps-NiCo-CT detektiert.

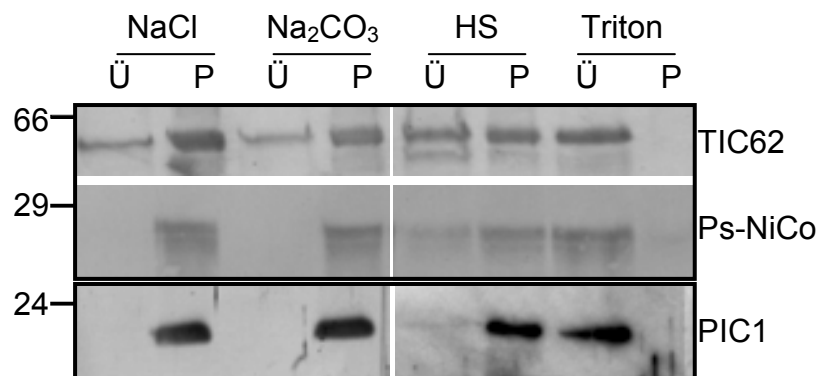


Abbildung 14: Membranintegration von NiCo

Gleiche Mengen (entsprechend 20µg Protein) isolierte Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbsen-Pflanzen wurden in Hochsalzpuffer (1M NaCl), Puffer mit hohem pH-Wert (0,1M Na_2CO_3 , pH 11,3), Harnstoff (HS, 8M) und Triton (1%) für 20 Minuten auf Eis bzw. bei Raumtemperatur (HS) inkubiert, durch Zentrifugation in Membran-Pellet (P) und Überstand löslicher Proteine (Ü) separiert und in einer SDS-Page aufgetrennt. Das Protein Ps-NiCo sowie die Kontrollproteine PIC1 und TIC62 wurden mit den jeweiligen, spezifischen Antikörpern detektiert. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Bei der Behandlung mit NaCl sowie mit Na_2CO_3 wurde das Ps-NiCo-Protein ausschließlich, bei der Behandlung mit Harnstoff zu Großteilen in der Membranfraktion (P) detektiert. Das gleiche Verhalten zeigte das zur Kontrolle detektierte, integrale Membranprotein PIC1. Durch die Behandlung mit Triton lösten sich alle drei Proteine aus den Hüllmembranen und wurden

im Überstand detektiert. Die Detektion des Proteins TIC62, ein nicht integriertes, sondern durch Proteininteraktionen an die Membran gebundenes Protein, zeigte eine höhere Löslichkeit in den verschiedenen Behandlungsansätzen. Dieses Ergebnis lässt auf eine Integration von NiCo in die innere Hüllmembran schließen.

V.2.5. Membranorientierung von NiCo

Um die Membranorientierung von NiCo zu bestimmen, wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit den Proteasen Thermolysin sowie Trypsin ein proteolytischer Verdau von Vesikeln der inneren chloroplastidären Hüllmembran aus Erbse durchgeführt. Beide verwendeten Proteasen können die Membranen unter kontrollierten Bedingungen nicht durchdringen, was ausschließlich zur Proteolyse der nach außen orientierten Proteinsegmente führt. Die entstandenen Proteinfragmente wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem spezifische gegen den C-Terminus des Ps-NiCo Proteins gerichteten Antikörper immunodetektiert. Als Nachweis des zuverlässigen Abstoppens der Proteaseaktivität wurden die Nullproben (Thermolysin, Abbildung 15A sowie mit Trypsin Abbildung 15B) mit den jeweiligen Inhibitoren vorbehandelt. Die Aktivität beider Proteasen konnte mit EDTA (Thermolysin) bzw. mit einer Kombination aus Trypsininhibitor und Macroglobulin (Trypsin) gestoppt werden.

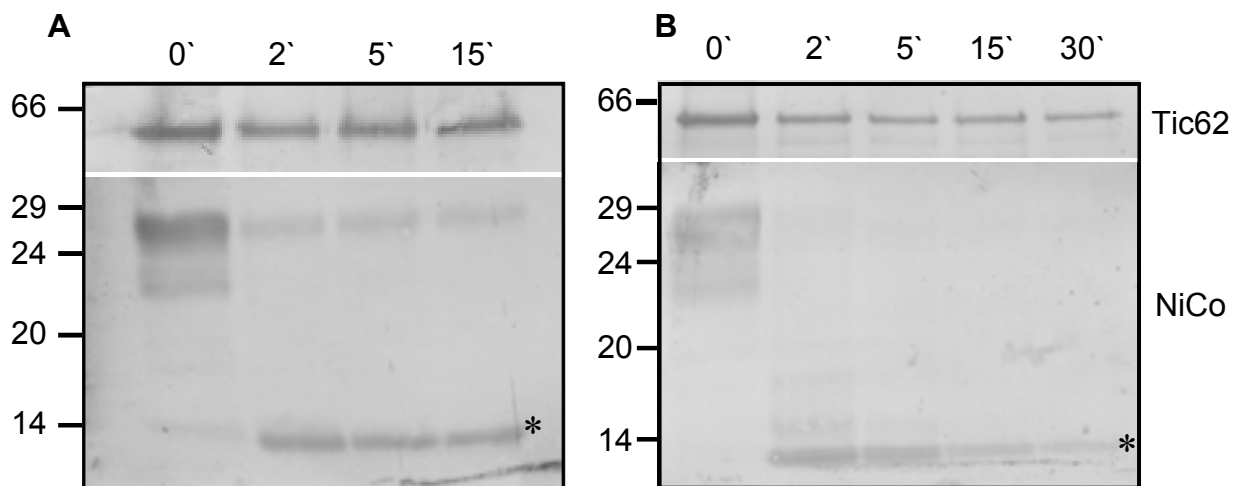


Abbildung 15: Proteolyse von NiCo in der inneren Hüllmembran

Gleiche Mengen (entsprechend 10µg Protein) isolierter Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbsen-Pflanzen wurden mit **(A)** Thermolysin (0,1µg/1µg Protein) über 0, 2, 5 und 15 Minuten und **(B)** Trypsin (1µg/1µg Protein) über 0, 2, 5, 15 und 30 Minuten inkubiert, anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem spezifisch gegen Ps-NiCo gerichteten Antikörper immunodetektiert. Der Stern markiert ein proteolytisches Proteinfragment des Ps-NiCo-Proteins bei ca. 12kDa. Antiserum gegen Tic62 wurde als Kontrolle verwendet. Als Kontrolle der Proteaseinaktivierung wurden die Vesikel mit den Inhibitoren EDTA (Thermolysin) sowie Trypsininhibitor und Macroglobulin (Trypsin) vorbehandelt (0'). Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

In unbehandelten Vesikeln konnte eine Bande bei ca. 28kDa, welche dem murenen Ps-NiCo-Protein entspricht (vergleiche Abbildung 13), detektiert werden. Als Kontrollprotein wurde TiC62 verwendet, welches sich innerhalb der Membranvesikel befindet und dadurch unempfindlich gegen eine Proteolyse mit Thermolysin und Trypsin ist. Zu allen Zeitpunkten beider Proteolysen konnte TiC62 in annähernd gleicher Stärke detektiert werden (Abbildung 15A und Abbildung 15B). Dies zeigt zum Einen die richtige "right-side-out" Orientierung der Hüllmembranvesikel (Keegstra und Youssif, 1986) und zum Anderen den gleichmäßigen Proteinauftrag in den Experimenten. In beiden Proteolysen konnte mit dem spezifischen Antikörper gegen das Ps-NiCo-Protein ein Proteinfragment auf der Höhe von ca. 12kDa nach bereits zwei Minuten der Proteolyse detektiert werden (Abbildung 15). Dieses Ergebnis entspricht einem Proteinfragment, resultierend aus dem proteolytischen Verdau der Peptidschleifen zwischen der zweiten und dritten sowie zwischen der vierten und fünften Membrandomäne (vgl. Abbildung 8). Ein weiteres, auf diesem Gel nicht detektierbares Proteinfragment umfasst die fünfte und sechste Transmembrandomäne und hat eine Größe von ca. 7kDa. Ein N-terminal entstehendes, ca. 11,6kDa großes Proteinfragment wird nicht von dem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper detektiert.

Als ein weiterer experimenteller Nachweis für die Orientierung des NiCo-Proteins in der Membran wurde in einem "PEGylierungsexperiment" die Substanz PEG-MAL (5kDa) herangezogen. PEG-MAL kann die Hüllmembran nicht durchdringen und geht mit den Thiolgruppen von Cysteinen, welche in den Vesikeln der Chloroplasten-Hüllmembranen nach außen orientiert sind, eine irreversible Verbindung ein. Mit jedem gebundenen PEG-MAL Molekül nimmt damit das Molekulargewicht eines Proteins um etwa 5kDa zu. Bei einer Immundetektion werden Proteine mit gebundenen PEG-MAL Molekülen dementsprechend in Banden höherer Masse repräsentiert. In dem zeitabhängigen Experiment wurde die PEG-MAL Inkubation von Vesikeln der inneren Chloroplasten-Hüllmembran mit DTT nach 0, 5, 10 sowie 30 Minuten abgestoppt, in einem Bis-Tris-Gel aufgetrennt und anschließend mit dem Ps-NiCo spezifischen Antikörper immunodetektiert. In allen Proben konnte eine, das Ps-NiCo-Protein repräsentierende Bande bei ca. 28kDa, aber keine Banden höherer Masse detektiert werden (Abbildung 16). Als Kontrolle für die "Pegylierung" wurde ein Ansatz während der PEG-MAL-Behandlung gleichzeitig für 30 Minuten mit SDS inkubiert, welches die Membranvesikel solubilisiert und somit alle Cysteine eines Membranproteins für PEG-MAL erreichbar macht. In der mit SDS behandelten Kontrollprobe wurde eine Bande bei ca. 55kDa detektiert, welche dem NiCo-Protein mit vier PEG-MAL gebundenen Cysteinen entspricht.

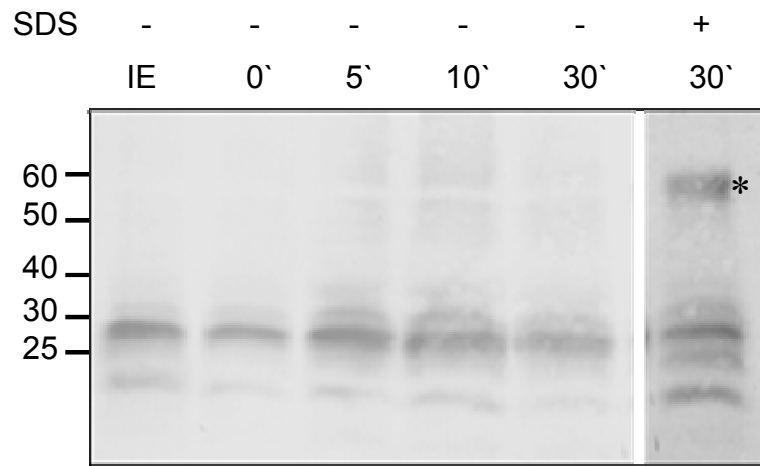


Abbildung 16: "PEGylierung" von NiCo

Gleiche Mengen (entsprechend 10µg Protein) isolierter Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbsen-Pflanzen wurden mit PEG-MAL für 0, 5, 10 und 30 Minuten inkubiert, anschließend in einem 10% Bis-Tris-Gel aufgetrennt und mit dem gegen α -Ps-NiCo-CT spezifischen Antikörper immunodetektiert. Als Kontrolle wurden solubilisierete Vesikel (+SDS) für 30 Minuten mit PEG-MAL behandelt. Eine höhermolekulare Bande ist in der mit SDS behandelten Kontrolle bei ca. 55kDa detektierbar (Stern). Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Cysteine Nummer "2" und "4" der löslichen Peptidschleife des Ps-NiCo-Proteins in das Innere der Hüllmembran-Vesikel, entsprechend dem Stroma *in planta*, orientiert sein müssen. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass NiCo stabil in der inneren, chloroplastidären Hüllmembran integriert ist und der C- sowie der N-Terminus in den Intermembranraum orientiert sind (siehe Abbildung 8)

V.2.6. NiCo-Expression in der Pflanze

Um einen Überblick über das Expressionsmuster der zwei *Arabidopsis* NiCo-Proteine zu erhalten, wurden die Daten aus den Experimenten des AtGenExpress Konsortiums (Affymetrix „GeneChip *Arabidopsis* ATH1 Genome Array“, Schmid *et al.*, 2005) für die verschiedenen Pflanzengewebe herangezogen. Expressionsdaten von At-NiCo1 waren auf dem ATH1-Chip nicht vorhanden. Durch die gesamte Entwicklung der Pflanze ist das *At-NiCo2*-Gen relativ gleichmäßig exprimiert, wobei eine leicht erhöhte Transkriptmenge im Sprossgewebe sieben Tage alter Pflanzen und im vierten Blatt 10 Tage alter Pflanzen zu finden ist (Abbildung 17). Eine Abnahme der Transkriptmenge ist in Stängelblättern sowie in seneszenten Blättern älterer Pflanzen zu verzeichnen. In der Samen- und Embryonalentwicklung kann ein Anstieg der Transkriptmenge ab dem achten Stadium ("gekrümmter"-Embryo) beobachtet werden. Von allen Blütengeweben ist die Transkriptmenge in den Blütenstielen und im Fruchtblatt am höchsten (Abbildung 17).

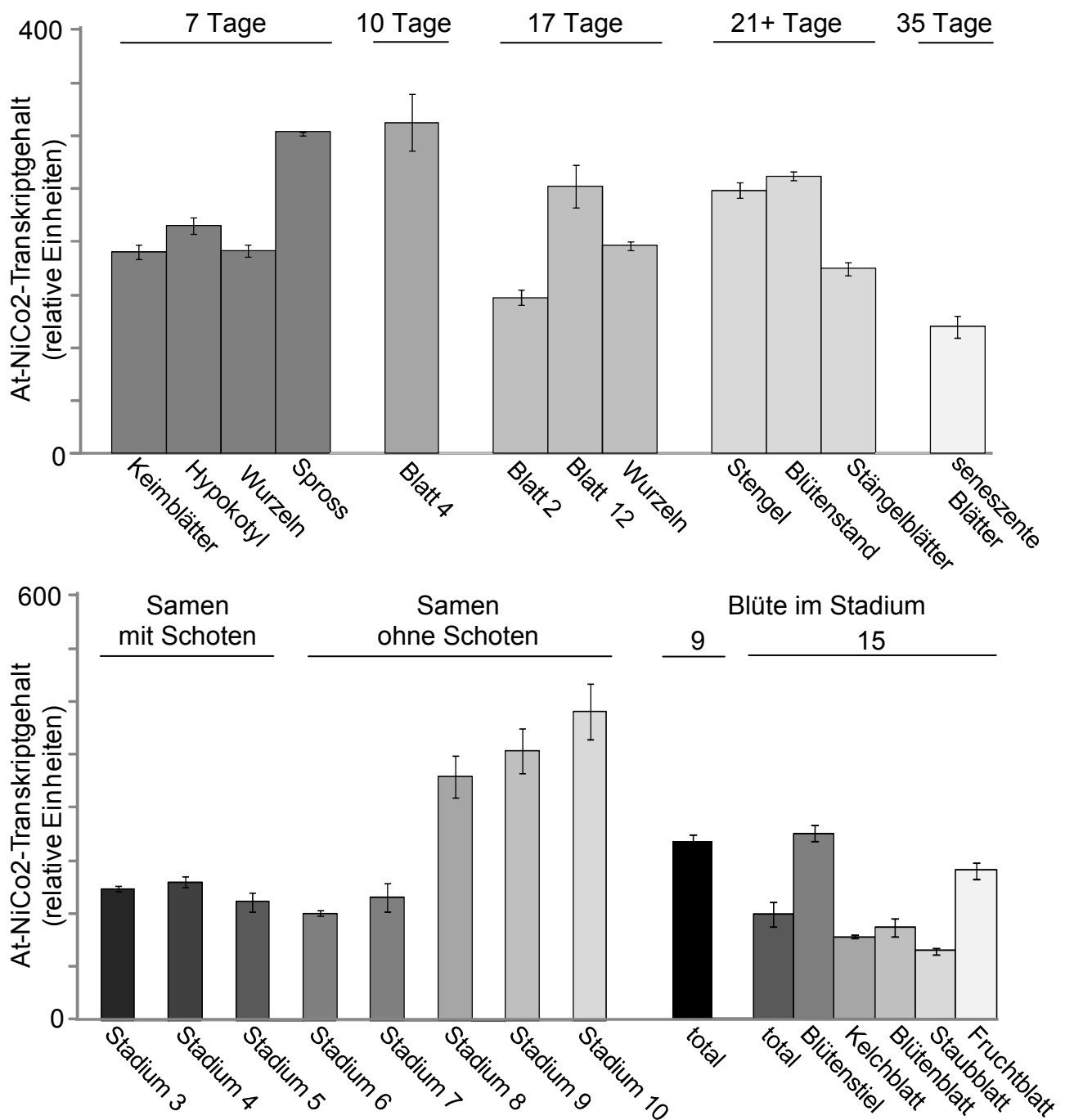


Abbildung 17: Expressionsmuster von *At-NiCo2* in *Arabidopsis*

Transkriptionsprofil des *At-NiCo2*-Gens während der Pflanzenentwicklung. Die Daten stammen aus Experimenten des AtGenExpress Konsortiums (Affymetrix „GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array“, Schmid *et al.*, 2005). Die Signalintensitäten wurden aus drei biologischen Wiederholungen (\pm SA) gemittelt. Das Alter der Pflanzen ist angegeben. Die Entwicklungsstadien der Embryonen sind wie folgt definiert: 3: Globuläres-Stadium; 4: Herz-Stadium; 5: Herz-Stadium; 6: Torpedo-Stadium; 7: Gehstock-Stadium; 8: "gekrümmter"-Embryo; 9: Kotyledonen-Stadium; 10: ergrünte Kotyledonen-Stadium.

Da sich die Expressionsdaten von *At-NiCo1* nicht auf dem Affymetrix ATH1-GeneChip befinden, wurde aus Blatt-, Wurzel- und Blütengewebe von 14 Tage alten *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col-0) sowie der *nico1-1* T-DNA-Insertionsmutante (siehe V.2.7) RNA isoliert und mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR der Transkriptgehalt analysiert (Abbildung 18). Zugleich wurde die Bestimmung des *At-NiCo1*-Transkriptgehalts in der *nico1-1* T-DNA-Insertionsmutante als Nachweis einer "knockout"-Mutation auf RNA-Ebene genutzt. Der Transkriptgehalt des *At-NiCo2*-Gens und des *PIC1*-Gens sollte zudem in der *nico1-1*-Mutante mit dem Transkriptgehalt in Wildtyppflanzen verglichen werden.

Die Analyse der Wildtyp-Pflanzen zeigte, dass der RNA Gehalt von *NiCo1* in den Blüten mit 4261 ± 250 relativen Einheiten (rE) wesentlich höher ist, als in den Blättern (907 ± 264 rE) und in den Wurzeln (1523 ± 356 rE, Abbildung 18). Die Expression von *NiCo2* hingegen ist in allen drei Geweben nicht signifikant unterschiedlich. Im Vergleich zu *NiCo1* ist die Expression von *NiCo2* in den Blättern um den Faktor zwei erhöht, in den Blüten hingegen ist *NiCo1* stärker exprimiert als *NiCo2* (Faktor 1,6). In den Wurzeln zeigen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede.

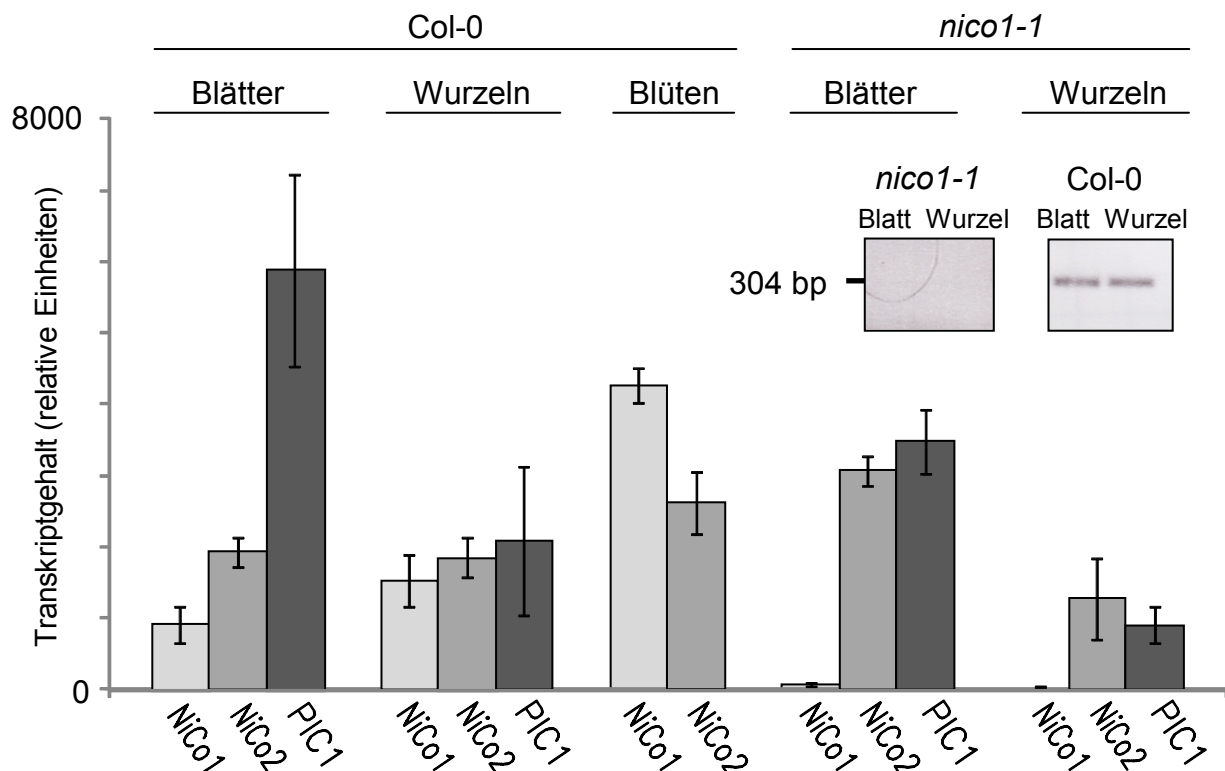


Abbildung 18: Expressionsmuster von *At-NiCo1*, *At-NiCo2* und *PIC1* in *Arabidopsis*

Quantifizierung des *At-NiCo1*-, *At-NiCo2*- sowie des *PIC1*-Transkriptgehalts in Blatt- und Wurzelgewebe aus 14 Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen sowie in Blütengewebe älterer Pflanzen (Col-0 Wildtyp und *nico1-1*-"knockout"-Mutanten) von mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR (relative Einheiten $n=3-5$; \pm SA), normiert auf 10.000 *PRAT3*-Transkripte. Oben rechts: Im Agarosegel aufgetrenntes PCR-Produkt mit den Primern *NiCo1*LCfw und *NiCo1*LCrev.

Vergleicht man die Expression von *NiCo1* und *NiCo2* mit der von *PIC1* in den Blättern, so ist diese um den Faktor 6,5 (*NiCo1*) bzw. um den Faktor 3,1 niedriger. In den Wurzeln zeigten sich keine Unterschiede im Transkriptlevel von *NiCo1*, *NiCo2* und *PIC1*. Der Transkriptgehalt von *NiCo2* war in den Blättern der *nico1-1*-Mutanten gegenüber den Wildtyp-Pflanzen um den Faktor 1,6 erhöht. Der *PIC1*-Transkriptgehalt hingegen wurde um den Faktor 1,7 reduziert. In Wurzelgewebe dagegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Bei der Analyse der *nico1-1*-Mutante wurde, wie erwartet, kein Transkript von *NiCo1* mehr nachgewiesen, was auf eine "knock out"-Mutante für *NiCo1* hindeutet (Abbildung 18).

V.2.7. Analyse von NiCo-Mutanten in *Arabidopsis*

Der Ausfall eines Proteines, welches eine essentielle Funktion in der Metallhomöostase erfüllt, führt, wie die Beispiele des Eisenaufnahmetransporters IRT1 (Varotto *et al.*, 2002; Vert *et al.*, 2002a) sowie der Eisenpermease PIC1 (Duy *et al.*, 2007b) zeigen, zu reduziertem Wachstum sowie zu Chlorosen. Weitere Beispiele sind die Verlustmutanten der chloroplastidären Kupfertransporter PAA1 und PAA2 (Shikanai *et al.*, 2003; Abdel-Ghany *et al.*, 2005), in denen der gestörte photosynthetische Elektronentransport drastische Wachstumsveränderungen hervorruft. Um die Funktion der Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 im Entwicklungszyklus der Pflanze näher zu untersuchen und eine mögliche Beteiligung in der Metallhomöostase zu untermauern, wurden im Folgenden Einzel- und Doppelmutanten in *Arabidopsis* untersucht.

V.2.7.1. Charakterisierung der *nico1-1*-Mutante

Für das Gen *At-NiCo1* stand in *Arabidopsis* eine heterozygote T-DNA-Insertionslinie (SAIL_1055) der dritten Generation (T3) zur Verfügung. Die T-DNA-Insertion war im Anfang des zweiten Exons annotiert und zur späteren Analyse wurden entsprechende Oligonukleotid-Primer generiert (Sail_1055fw und Sail_1055rev), welche die Insertion flankieren. Die Samen wurden zur Vermehrung ausgelegt und die vierte Generation (T4) von zehn Pflanzen (Linie #1 - #10) getrennt geerntet und erneut ausgesät. Um die Homo- bzw. Heterozygotie oder das Wildtypverhalten im Bezug auf die T-DNA-Insertion zu analysieren, wurde genomische DNA 20 Tage alter Keimlinge der Linien #1 bis #10 isoliert und über den Insertionsbereich der T-DNA eine PCR mit den genspezifischen Oligonukleotid-Primern Sail1055-fw und Sail1055-rev durchgeführt. Im Gegensatz zur PCR auf Wildtyp-DNA konnte kein PCR-Produkt auf der DNA aller Pflanzen der Linien #5 nachgewiesen werden

(Abbildung 19A). Eine zweite PCR mit dem genspezifischen Oligonukleotid-Primer Sail1055-rev und dem T-DNA spezifischen Oligonukleotid-Primer LB2SAIL (Abbildung 19B) bestätigte, durch das Auftreten des spezifischen PCR-Produkts mit einer erwarteten Größe von 333 Basenpaaren, das Vorhandensein der T-DNA in allen getesteten Pflanzen der Linie #5 und somit die Homozygotität auf die T-DNA-Insertion. Die Kontroll-PCR mit den Oligonukleotid-Primern für Aktin (Actfw und Actrev) zeigten eine gleichmäßige Menge der in der PCR genutzten DNA-Menge an (Abbildung 19C).

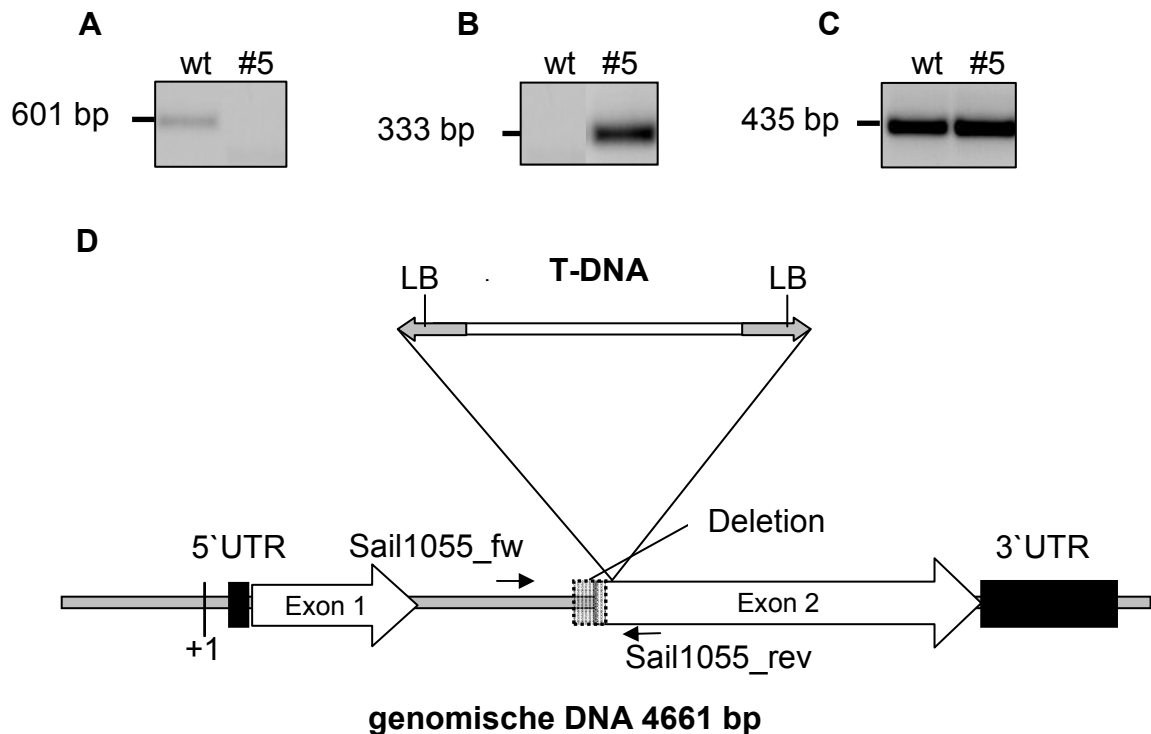


Abbildung 19: Charakterisierung der *nico1-1*-Insertionslinie

(A-C) PCR auf genomischer DNA von 20 Tagen alten *Arabidopsis* Keimlingen des Ecotyps Col-0 (WT) sowie der *nico1-1* T-DNA-Insertionslinie #5. Genspezifische Oligonukleotid-Primer 1055Sail-fw und 1055Sail-rev (A), 1055Sail-rev sowie dem T-DNA spezifischen Primer LB2SAIL (B) und den Primer Actfw und Actrev (C). (D) Das *NiCo1*-Gen mit der Position der identifizierten T-DNA-Insertion sowie den genspezifischen Oligonukleotid-Primern zur PCR-Genotypisierung. Die Exonbereiche sind durch weiße Pfeile, sowie 5'UTR (50 bp) und 3'UTR (309 bp), durch schwarze Balken dargestellt. Der vorhergesagte Transkriptionsstart (+1), die Position und Richtung der beiden "left border"-T-DNA-Sequenzen (LB) sind angegeben.

Das PCR-Produkt zwischen dem genspezifischen Oligonukleotid-Primer Sail1055-rev und dem T-DNA spezifischen Oligonukleotid-Primer LB2SAIL (Abbildung 19B) wurde sequenziert und die genaue Lage der T-DNA-Insertion am Beginn des zweiten Exons, 943 bp nach Transkriptionsstart (+1) bestimmt. Eine weitere PCR mit dem Oligonukleotid-Primer Sail1055-fw und dem T-DNA spezifischen Oligonukleotid-Primer LB2fw konnte nachweisen, dass auch am 5'-Ende der T-DNA-Insertion eine "left border"-Region vorhanden

ist. Des Weiteren wurde eine Deletion von 36 Bp vor der T-DNA-Insertion nachgewiesen (siehe Abbildung 19D).

Bei der Analyse des *At-NiCo1*-Transkriptgehaltes in der *nico1-1*-Mutante konnte bereits ein Verlust auf RNA-Ebene gezeigt werden (siehe Abbildung 18). In einer Immunoblotanalyse, mit dem spezifisch gegen *At-NiCo1* gerichteten Antikörper, sollte der Nachweis auf Proteinebene erbracht werden. In der Hüllmembranfraktion aus der *nico1-1*-Mutante konnte, im Vergleich zur Hüllmembranfraktion aus Col-0 (WT), keine *At-NiCo1* repräsentierende Proteinbande auf ca. 28kDa mehr nachgewiesen werden (Abbildung 20). Dies zeigt einen Verlust von *At-NiCo1* in der *nico1-1*-Mutante auch auf Proteinebene auf.

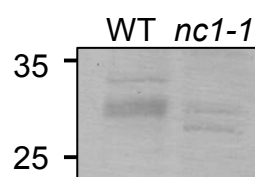


Abbildung 20: Immunoblot auf Col-0- und *nico1-1*-Hüllmembranfraktionen

Es wurden gemischte Hüllmembranen aus Chloroplasten von vier Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen des Ecotyps Col-0 (WT) sowie der *nico1-1*-Mutante (*nc1-1*) isoliert und gleiche Mengen (entsprechend 10µg Protein) über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunodetektion erfolgte mit dem gegen *At-NiCo1* gerichteten Peptidantikörper. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Bei der phänotypischen Analyse der *nico1-1* T-DNA-Insertionsline konnte unter standardisierten Wachstumsbedingungen (Langtag) ein normaler, grüner Wildtyp-Phänotyp beobachtet werden.

V.2.7.2. NiCo2-Mutanten in *Arabidopsis*

Für eine phänotypische Analyse von *At-NiCo2*-Mutanten wurden bei NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, Nottingham, UK) sechs Linien (N92203, N94702, N93683, N91284, N91253, N93723) von *Arabidopsis* Mutanten, welche jeweils unterschiedliche Punktmutationen (TILLING Ansatz) des *At-NiCo2*-Gens tragen, bestellt. Bei allen Linien führte keine der Mutationen zu einer Änderung der Aminosäure in ein Stopcodon, welches ein Abbruch der Translation zur Folge hätte, sondern nur zu einem Aminosäureaustausch. Von allen bestellten Linien wurden Samen ausgebracht und die Pflanzen bis zur Samenreife unter Standardbedingungen angezogen. Im Folgenden wurde genomische DNA von ca. 21 Tagen alten Keimlingen aller Linien isoliert, eine PCR mit den genspezifischen Oligonukleotid-Primern über die annotierten punktmultierten Basenpaare durchgeführt und das resultierende PCR-Produkt sequenziert. Auftretende, vom Wildtyp abweichende Phänotypen konnten bei keiner der analysierten Linien durch genotypische Untersuchungen auf eine Mutation des

At-NiCo2-Gens zurückgeführt werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass Hintergrundmutationen anderer Gene verantwortlich sind und somit wurde die Arbeit an diesen Pflanzenlinien eingestellt.

Um eine Verlustmutante von *At-NiCo2* analysieren zu können, wurden fünf unabhängige Linien einer *At-NiCo2*-RNAi-"knock down"-Mutante in Col-0-Wildtyp-Hintergrund durch stabile, Agrobakterien vermittelte Transformation erzeugt. Es wurde ein mit Dexamethason induzierbares RNAi-System gewählt (Wielopolska *et al.*, 2005). Unter der Kontrolle des induzierbaren "pOp6"-Promotors befindet sich im genutzten pOpOFF-Plasmidvektor ein "GUS"-Reportergen sowie das RNAi-Konstrukt der pHELLSGATE-Kassette "ccdB-int-ccdB" (Abbildung 21).

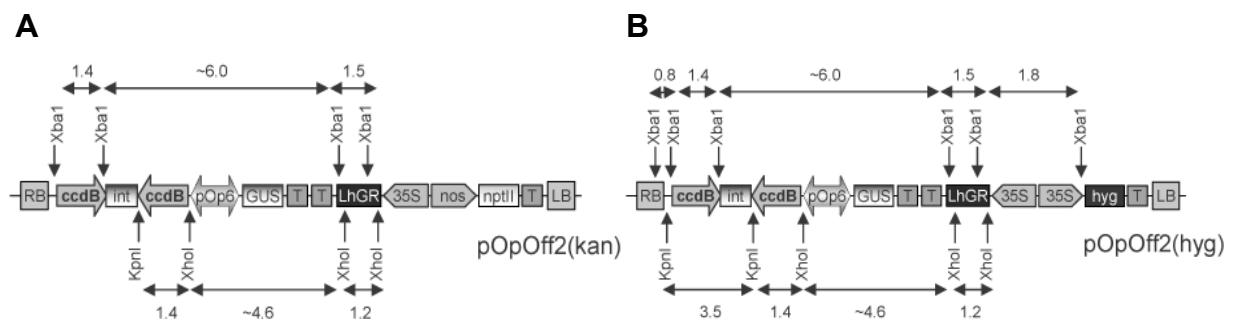


Abbildung 21: Der pOpOff2-Vektor

Schematische Darstellung der pOpOff2-Transformationskassette mit dem pflanzlichen Selektionsmarker Kanamycin (pOpOff2(kan), **(A)**) sowie Hygromycin (pOpOff2(hyg), **(B)**). T: Terminator; LB linke Grenze (engl.: "left border"); RB: rechte Grenze (engl.: "right border"); ccdB-int-ccdB: pHELLSGATE12-Kassette; pOp6: induzierbarer pOp6-Promotor; GUS: GUS-Reporter-Gen; 35S: constitutiver Promotor (CaMV); nos: Nopalinsynthese-Promotor; nptII; pfl. Kanamycin Resistenzmarker; hyg: Hygromycin-Resistenzmarker. (Abbildung übernommen von CSIRO hairpinRNAi; <http://www.pi.csiro.au/RNAi>)

Bei der Anzucht der T2-Pflanzen auf 1/2-MS-Medium (+10µM Dexamethason) wurde die Induktion des RNAi-Mechanismus an 10 Tage alten Keimlingen mit Hilfe des GUS-Reportergens nachgewiesen. Phänotypische Untersuchungen unter standardisierten Wachstumsbedingungen ergaben keine Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Da beide NiCo-Einzelmutanten (*nico1-1* und *NiCo2*-RNAi) in *Arabidopsis* einen Wildtyp-Phänotyp zeigten, sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich ein Ausschalten des *At-NiCo2*-Gens durch RNAi, in der *nico1-1*-Mutante auf das Wachstumsverhalten der Pflanze auswirkt.

V.2.7.3. RNAi-"knock down" von At-NiCo2 im *nico1-1*-Hintergrund

Um eine At-NiCo2-"knock down"-Mutante in *nico1-1*-Hintergrund zu erzeugen, wurde die homozygote *nico1-1*-Mutante (T4, Linie #5) mit dem RNAi-Konstrukt At-NiCo2-RNAi/pOpOff2(hyg) stabil transformiert. Die Transformanten wurden anschließend über den pflanzlichen Antibiotika-Resistenzmarker Hygromycin selektiert und mittels PCR auf das Vorhandensein der Transformatinskassette genotypisiert. Die Linien #3, #4, #8 wurden in die zweite Generation (T2) vermehrt, die Samen auf selektivem, antibiotikumhaltigem Medium ausgesät und somit auf homo- und heterozygotes Genotypverhalten im Bezug auf die Transformationskassette selektiert. Mehrere der selektierten, 14 Tage alten Keimlinge wurden direkt auf Dexamethason haltiges Medium umgesetzt und alle 24 Stunden auf Induktion mittels des "GUS"-Reportergens überprüft. Nach 72 Stunden konnte eine starke Blaufärbung beobachtet werden (Abbildung 22A). Zudem wurde drei, vier und zehn Tage nach dem Beginn der Induktion aus den Keimlingen der Line #3 und #8 RNA isoliert und mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR der *At-NiCo2*-Transkriptgehalt analysiert (Abbildung 22B) und zudem auch die phänotypischen Veränderungen festgehalten (Abbildung 22C). Einige der selektierten, 14 Tage alten Keimlinge wurden auf Erde überführt und der RNAi-Mechanismus nach weiteren zwei Wochen Wachstum, durch Zugabe von Dexamethason (10µM) in das Gieswasser, induziert. Die nekrotischen Läsionen, welche zehn Tage nach Induktion in den Blättern auftraten (Abbildung 22D) hatten auf das weitere Pflanzenwachstum sowie deren Entwicklung keinen Einfluss.

Nach der Induktion des RNAi-Mechanismus zeigte sich der Transkriptgehalt des *At-NiCo2*-Gens in der Linie #3 nach vier Tagen auf 22%, nach sieben Tagen auf 14% und nach zehn Tagen auf 10% reduziert. In der Line #8 betrug der Transkriptgehalt nach vier Tagen 13%, nach sieben Tagen 10% und nach zehn Tagen 21% (Abbildung 22B). Die Reduktion des Proteingehalts von At-NiCo1 und At-NiCo2 konnte, aufgrund zu geringer Sensitivität der vorhandenen Antikörper, bisher nicht gezeigt werden, wird aber angenommen. Die erzeugten NiCo1/2-Doppelmutanten werden im Folgenden als *nico1/2-dm* #3, #4 und #8 bezeichnet. Die Beobachtung des Phänotyps zeigte, dass der Verlust von beiden NiCo-Proteinen in der *nico1/2-dm* drastische Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Pflanze hat. Es konnte vier Tage nach Induktion, bei Linie #3 und #8, eine sich vom Blattansatz in das Blatt hinein ausbreitende Chlorose beobachtet werden (Abbildung 22C). Die Entwicklung neuer Blätter stagnierte nach sieben Tagen. Zehn Tage nach der Induktion lag ein komplett chlorotischer Keimling vor.

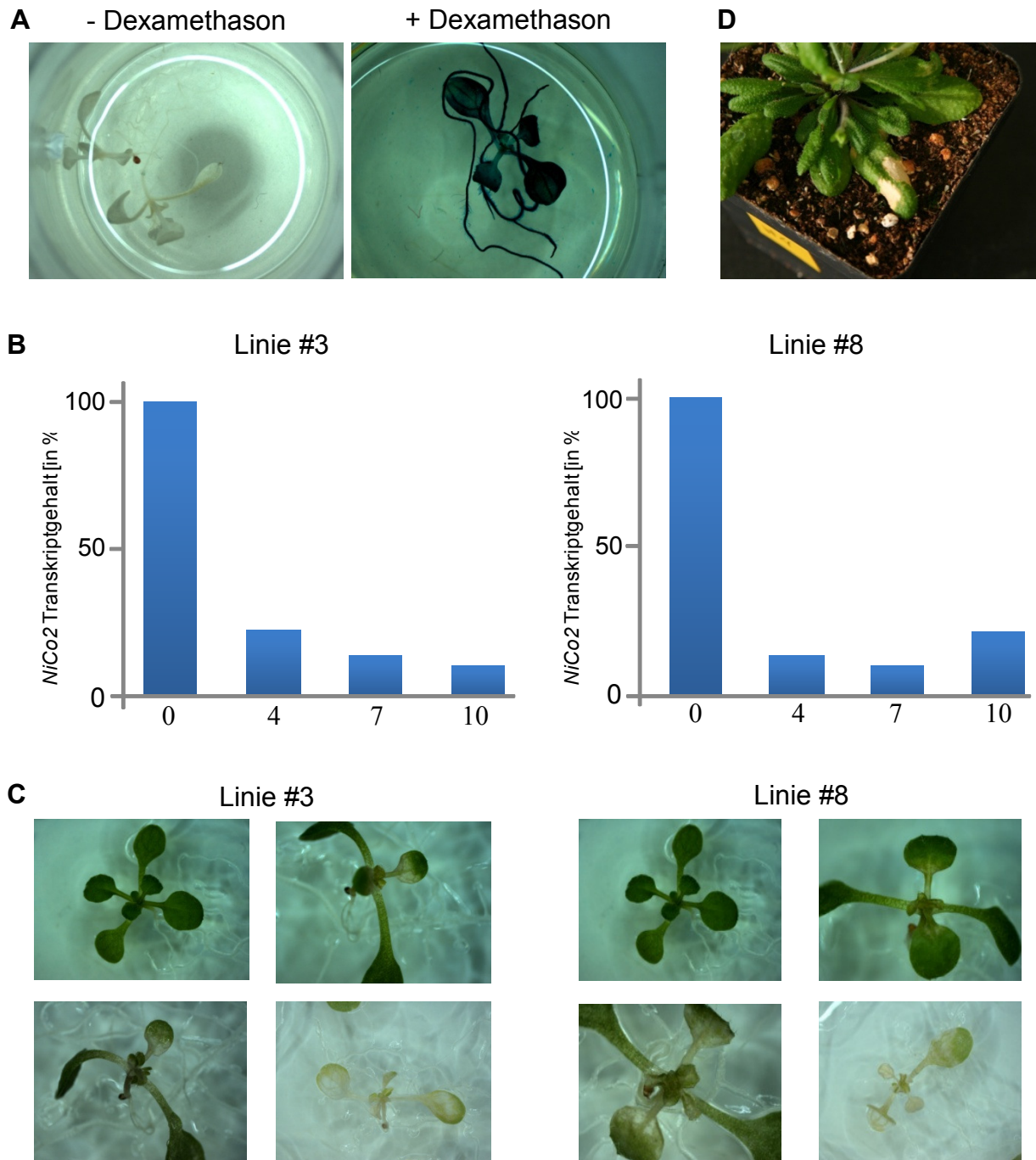


Abbildung 22: Charakterisierung der *nico1/2-dm*

(A) 14 Tage alte Keimlinge der *nico1/2-dm* Linie #3 und #8 wurden auf 1/2 MS-Medium ohne Dexamethason (links) und mit 10 μ M Dexamethason (rechts) überführt und die Induktion nach drei Tagen mittels GUS-Färbung überprüft. **(B)** Quantifizierung des *At-NiCo2*-Transkriptgehalts in 14 Tage alten, induzierten *nico1/2-dm* #3 und #8 vor der Induktion sowie vier, sieben und zehn Tage nach der Induktion mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR (n=1; ohne SA). Der NiCo2 mRNA-Gehalt wurde auf 10.000 PRAT3-Transkripte normiert. **(C)** Phänotypische Veränderungen der Linien #3 und #8 zu den Erntezeitpunkten vor sowie vier, sieben und zehn Tage nach Induktion sind abgebildet. **(D)** Die *nico1/2-dm*, Linie #8, auf Erde angezogen und nach vier Wochen mit 10 μ M Dexamethason induziert. Phänotypische Veränderungen sind zehn Tage nach der Induktion festgehalten.

Für weitere Analysen der *nico1/2-dm* wurden für das NiCo2-RNAi-Konstrukt homozygote Samen der Linien #3, #4 und #8 gewonnen. Hierzu fand eine Selektion der T2-Samen auf Hygromycin haltigem Medium (25µg/ml) statt. Die homo- und heterozygoten Pflanzen wurden bis zur Samenreife angezogen und getrennt geerntet (T3-Samen). Durch erneute Aussaat der T3-Samen auf Hygromycin-Medium konnten, aufgrund ausbleibender Aufspaltung, homozygote Samen bestimmt werden. Diese wurden durch PCR-Genotypisierung als homozygot bestätigt.

Für die folgende Metallgehalt- sowie Transkriptom-Analyse (siehe V.2.7.4 und V.2.7.5) wurden homozygote Samen der Linien #3, #4 und #8 auf, mit PROPYLTEX-Netzen (210µM Maschengröße, SEFAR GmbH, Edling, Deutschland) belegtem 1/2-MS-Medium ausgebracht (n=5). Gleich behandelt wurde die Wildtyp-Kontrolllinie Col-0 sowie Kontrolllinie Luciferase, welche ein induzierbares RNAi-Konstrukt eines Luciferase-Gens in dem pOpOFF2-Vector enthält (erhalten von Ian Moore, Department of Plant Sciences, Oxford). Nach 14 Tagen wurden die Keimlinge mit Hilfe des Netzes auf induzierendes Medium (10µM Dexamethason) überführt. Vor der Induktion, sowie zwei, vier, sieben und zehn Tage nach der Induktion wurden jeweils zehn Keimlinge in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Stichpunktartig (n=2) wurde mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR die Reduktion des *At-NiCo2*-Transkriptgehalts bestätigt sowie die phänotypische Veränderungen in allen drei Linien festgehalten (Daten nicht gezeigt). In den Linien #4 und #8 zeigte sich die Transkriptreduktion und die phänotypische Ausprägung der Chlorosen am stärksten. Aus diesem Grund wurden diese für die folgenden Versuche verwendet.

V.2.7.4. Metallgehaltanalyse in der *nico1/2*-Doppelmutante

Um mehr Aufschluss über eine mögliche Funktion der NiCo-Proteine in der Metallhomöostase zu erhalten, wurden zwei unabhängige Linien der *nico1/2-dm* (Linie #4 und Linie #8) auf deren Metallgehalt vor, sowie zehn Tage nach der Induktion des NiCo2-RNAi-Mechanismus untersucht. Mit Hilfe von Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES, engl.: "inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy") und Massenspektrometrie (für Nickel, Kobalt) wurde der Gehalt von Kobalt (Co), Kupfer (Cu), Eisen (Fe), Zink (Zn), Nickel (Ni) sowie Mangan (Mn) bestimmt (Institut für Anorganische Analytik, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Abbildung 23). Die Linie Luciferase (Luc) wurde als Hintergrundkontrolle des RNAi-Mechanismus verwendet. *Arabidopsis*-Pflanzen (Col-0) wurden als Wildtyp-Kontrolle verwendet.

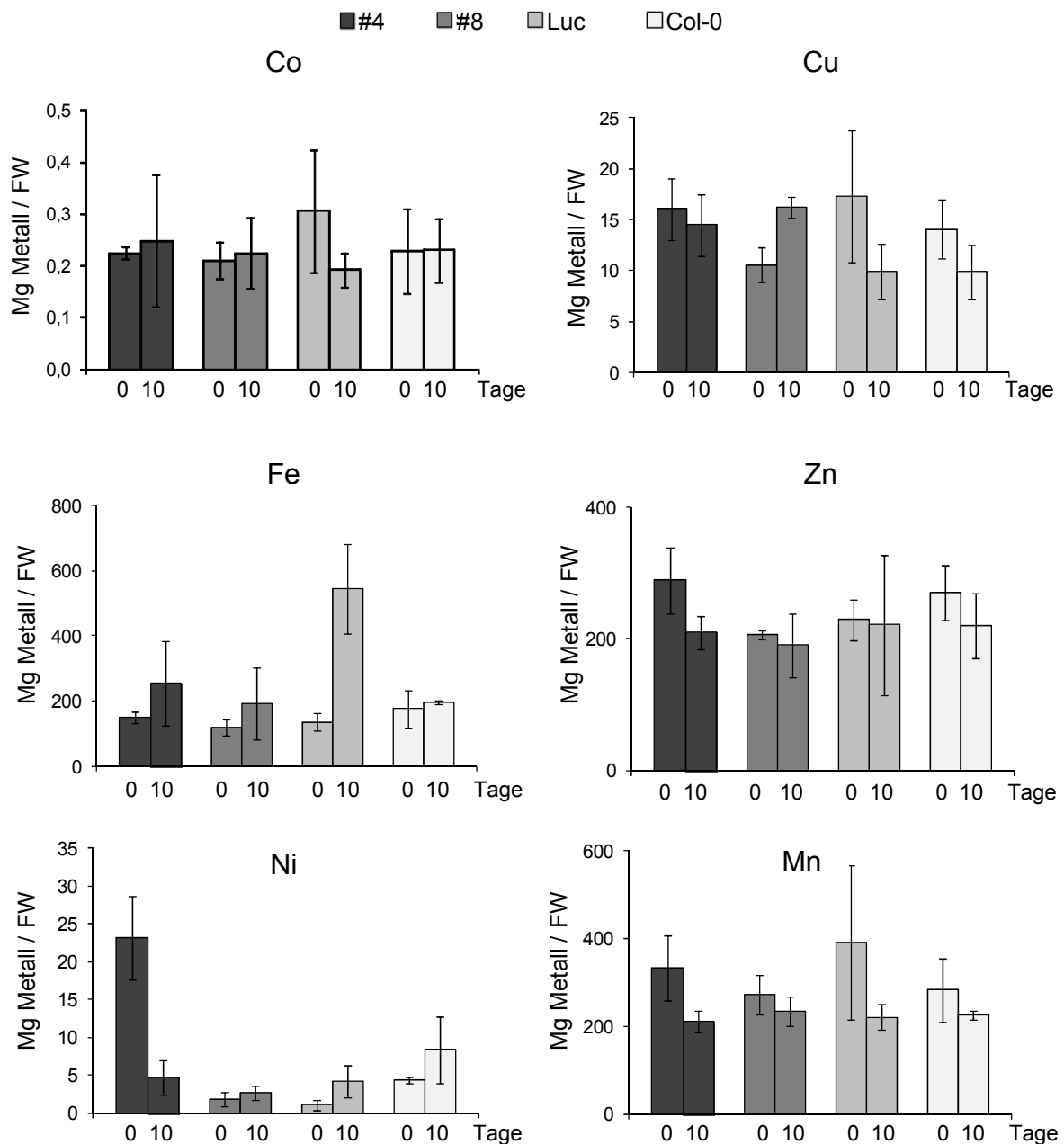


Abbildung 23: Metallgehalt der *nico1/2-dm*

Der Metallgehalt ist in mg pro kg Frischgewicht (FW) angegeben (n=3, \pm SD). Gemessen wurde in 14 bzw. 24 Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen der *nico1/2-dm* Linie #4 und #8, Wildtyp-Pflanzen (Col-0) sowie einer Kontrolllinie (Luc). Grafisch dargestellt sind die Messungen der Metalle Cobalt (Co), Kupfer (Cu), Eisen (Fe), Zink (Zn), Nickel (Ni) sowie Mangan (Mn) vor der Induktion (0) sowie zehn Tage nach der Induktion (10) des *At-NiCo2*-RNAi-Mechanismus.

Bei den Metallen Co, Cu, Zn und Mn sind bei allen Linien keine signifikanten Unterschiede in einem Vergleich der Konzentrationen vor bzw. zehn Tage nach der NiCo2-RNAi Induktion gemessen worden (Abbildung 23). Die Konzentration von Kobalt liegt gleichmäßig bei 0,2 bis 0,3mg pro kg Frischgewicht der Pflanzen. Die Konzentration an Kupfer beträgt zwischen 10mg und 16mg, bei Zink 200-300mg und bei Mangan liegen die Messungen bei 200-380mg pro kg Frischgewicht. Bei dem Eisengehalt der Wildtyplinie Col-0 ist ein Anstieg von 134mg vor der Induktion auf 544mg zehn Tage nach der Induktion zu verzeichnen. Bei den Linien #4 und #8 bleibt die Konzentration dagegen relativ konstant bei ca. 150-250mg pro kg Frischgewicht. Allerdings konnte der Konzentrationsanstieg bei der zweiten Kontrolllinie "Luciferase" nicht bestätigt werden. Der erhöhte Wert der Nickelkonzentration von 23mg der Linie #4 vor der Induktion deutet auf einen Messfehler hin, da alle anderen Linien Konzentrationen von unter 5mg Nickel pro kg Frischgewicht aufweisen.

Mit dem ausbleibenden Anstieg der Eisenkonzentration in beiden Linien der *nico1/2-dm* gegenüber der Wildtyp-Pflanze Col-0, ein möglicher Einfluss des Verlusts von NiCo auf die Eisenhomöostase der Pflanze. Allerdings konnte dies in der zweiten Kontrolllinie Luciferase nicht bestätigt werden.

V.2.7.5. Transkriptom-Analyse der *nico1/2-dm*

Um die Funktion der NiCo-Proteine zu bestimmen, wurde in der *nico1/2-dm* (Linie #4 und Linie #8, T3), neben der Analyse des Metallgehalts (siehe V.2.7.4), auch die Genexpression mittels DNA-Microarrays bestimmt. Es wurde vor sowie zwei und sieben Tage nach der Induktion des NiCo2-RNAi Mechanismus das Transkriptom der *nico1/2-dm* untersucht und mit dem der Wildtyp-Pflanzen (Col-0, Luciferase-Kontrolllinie) verglichen. Die Auswertung und der Vergleich der Genregulation mit den Wildtyplinien erfolgte mit dem Programm MAPMAN/Robin (Lohse *et al.*, 2010b) und wurde von Dr. Katrin Philipp (Department Biologie I, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, LMU München) durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurden Transkriptsignale der *nico1/2-dm* Linien #4 und #8 (#4: n=3; #8: n=2) mit den Signalen der Wildtyplinien (Col-0: n=3; Luciferase: n=3) verglichen (Signifikanzschwellenwert "p-value" von 0,05).

Drei bereits vor der Induktion regulierte Gene wurden auch in den Expressionsdaten der späteren Erntezeitpunkte wiedergefunden und somit als Hintergrund in den weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt. Nach zwei Tagen zeigten in den *nico1/2-dm* nur zwei Gene (At5g60970: AtTCP5, TCP-Typ-Transkriptionsfaktor; At1g13940: unbekannte Funktion) einen erhöhten und ein Gen (At2g42610: LSH10, unbekannte Funktion) einen erniedrigten

Transkriptgehalt im Vergleich zum Wildtyp. Sieben Tage nach der Induktion war bereits die Expression von 2043 Genen induziert und die von 2016 Genen reprimiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Regulation der Genexpression in der *nico1/2-dm*

Übersicht über die Genregulation in der *nico1/2-dm* (Linie #4 und Linie #8), im Vergleich zum Wildtyp (Col-0, Luciferase) sieben Tage nach At-NiCo2-RNAi Induktion. Angegeben ist die Anzahl der insgesamt signifikant regulierten Gene, der um den Faktor 2 oder mehr (FCH>2) regulierte Gene mit einer Signaldifferenz größer 30 (SigD>30) sowie die mindestens um den Faktor 10 (FCH>10) induzierten bzw. mindestens um den Faktor 4 (FCH>4) reprimierten Gene.

	induzierte Gene	reprimierte Gene
regulierte Gene (gesamt)	2043	2016
regulierte Gene (FCH>2, SigD>30)	736	215
induziert (FCH>10, SigD>30)	68	
reprimiert (FCH>4, SigD>30)		17

Nach der Festlegung der Kriterien einer minimalen, signifikanten Regulationsstärke von Faktor 2 und einer Signaldifferenz höher als 30 im Vergleich *nico1/2-dm* gegen Wildtyp, grenzte sich die Zahl auf 736 in *nico1/2-dm* stärker bzw. 215 schwächer exprimierter Gene ein und zeigte damit einen deutlichen Fokus auf der Induktion der Expression. Auch in der Regulationsstärke konnte dieser Fokus beobachtet werden. 68 der induzierten Gene wurden um mehr als Faktor 10 (FCH>10), und nur 17 der reprimierten Gene um Faktor 4 oder mehr (FCH>4) reguliert.

Bei der Einteilung der regulierten Gene in funktionelle Gruppen zeigte sich eine breite Verteilung der 951 Gene auf 35 der insgesamt 41 MAPMAN-Kategorien (Lohse *et al.*, 2010a, Tabelle 8). Eine Auswertung nach dem prozentuellen Anteil der regulierten Gene jeder Gruppe zeigte, dass dieser nur in den Gruppen "Fermentation", "Gluconeogenese/Glyoxylatzyklus" und "biotischer Stress" bei 10% oder mehr lag. Alle regulierten Gene dieser Gruppen waren zudem ausnahmslos induziert. In der nur wenige Gene umfassenden Gruppe "Fermentation" betraf dies allerdings nur zwei von 14 Gene: PDC2, eine Pyruvat-Decarboxylase (At5g54960) sowie eine Laktat/Malat-Dehydrogenase (At4g17260). In der ebenfalls kleinen Gruppe "Gluconeogenese/Glyoxylatzyklus" wurde nur eines von 10 Genen, PPKK, eine Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (At4g15530), stärker exprimiert. In der 444 Gene umfassenden Gruppe "biotischer Stress" waren hingegen 60 induziert. Bei der Betrachtung der Ergebnisse nach der Anzahl, der in der jeweiligen Gruppe regulierten Gene, waren nur in den sechs Gruppen "Signalgebung" (82), "RNA" (62), "diverse Gene" (60), "Transport" (48), "Proteindegradierung" (39) und "Proteine" (33) mehr als 30 Gene induziert.

Mehr als 10, in ihrer Expression reprimierte Gene, befanden sich in den Gruppen "RNA" (22), "Zellwand" (21), "Signalgebung" (20) und "Hormonmetabolismus" (12; Tabelle 8).

Tabelle 8: In der *nico1/2-dm* regulierte Gene sortiert nach funktionellen Gruppen

Übersicht über die funktionellen Gengruppen und deren Regulation in der *nico1/2-dm* (Linie #4 und Linie #8), im Vergleich zum Wildtyp (Col-0, Luciferase). Angegeben ist der Name der funktionellen Gruppe nach MAPMAN-Kategorien (Lohse *et al.*, 2010a), die insgesamt enthaltenen Gene sowie die Anzahl und deren Anteil in Prozent der induzierten bzw. der reprimierten Gene einer Gruppe. Kriterien der Regulation: FCH>2; SigD>30 (vgl. Tabelle 7).

funktionelle Gruppen	Gene gesamt	induziert		reprimiert	
		Gene	in %	Gene	in %
Photosynthese	205	0	0,0	1	0,5
Haupt- ("major") CHO-Metabolismus	119	3	2,5	1	0,8
Neben- ("minor") CHO-Metabolismus	120	6	5,0	3	2,5
Glykolyse	63	3	4,8	0	0,0
Fermentation	14	2	14,3	0	0,0
Gluconeogenese / Glyoxylatzyklus	10	1	10,0	0	0,0
Zitratzyklus (TCA)	75	1	1,3	0	0,0
mitochondrieller Elektronentransport / ATP Synthese	125	5	4,0	0	0,0
Zellwand	471	13	2,8	21	4,5
Fettmetabolismus	375	7	1,9	7	1,9
N-Metabolismus	24	1	4,2	0	0,0
Aminosäure-Metabolismus	229	6	2,6	1	0,4
sekundärer Metabolismus	407	22	5,4	5	1,2
Hormonmetabolismus	470	28	6,0	12	2,6
Co-Faktor- und Vitamin-Metabolismus	75	3	4,0	0	0,0
biotischer Stress	444	60	13,5	0	0,0
abiotischer Stress	379	9	2,4	6	1,6
Redox	201	7	3,5	3	1,5
Polyamin-Metabolismus	15	0	0,0	1	6,7
Nucleotid-Metabolismus	161	6	3,7	1	0,6
Oxidasen: Kupfer, Flavone etc.	100	5	5,0	0	0,0
Cytochrom P450	199	11	5,5	1	0,5
Peroxidasen	66	5	7,6	0	0,0
diverse Gene	945	60	6,3	27	2,9
RNA	2474	62	2,5	22	0,9
DNA	997	2	0,2	1	0,1
Proteindegradierung	1504	39	2,6	5	0,3
Proteine	1642	33	2,0	3	0,2
Signalgebung	1190	82	6,9	20	1,7

Zellorganisation	711	16	2,3	9	1,3
Pflanzenentwicklung	659	28	4,2	8	1,2
Metallhomöostase	64	3	4,7	0	0,0
Metalltransport	90	3	3,3	1	1,1
Transport	846	48	5,7	6	0,7
Unbestimmt	7662	156	2,0	50	0,7

Bei der Betrachtung der Stärke der Induktion oder der Repression zeigte sich, dass die induzierten Gene um einen wesentlich höheren Faktor induziert waren, als die reprimierten Gene reprimiert. Die Expression der fünf am stärksten induzierten Gene wurde um den Faktor 104, 60, 57, 57 bzw. 48 erhöht (Tabelle 9). Im Gegensatz dazu wurde die Expression des am stärksten reprimierten Gens "nur" um den Faktor 6 erniedrigt. Drei der fünf am stärksten induzierten Gene gehörten zu der Gruppe "biotischer Stress", die zwei anderen Gene zu "Zellwand" bzw. "Unbestimmt", wobei letzteres (LURP1, "late upregulated in response to *Hyaloperonospora parasitica*") auch auf biotischen Stress hindeuten könnte. Die fünf in ihrer Expression am stärksten reprimierten Gene verteilten sich auf die fünf funktionellen Gruppen "Diverse Gene", "Neben-CHO-Metabolismus", "Zellwand", "Signalgebung" und "Fettmetabolismus" (Tabelle 9).

Tabelle 9: Die fünf am stärksten reprimierten sowie induzierten Gene in der *nico1/2-dm*
Angabe sind deren AGI-Code, der Name der Gene, die funktionelle Gruppe, ihre Funktion sowie der Faktor der Regulation (FCH).

AGI-Code	Name	Gruppe	Funktion	FCH
At3g22231	PCC1	biotischer Stress	unbekannte Funktion, involviert in die Regulation der Blühzeit	104
At2g14560	LURP1	unbestimmt	unbekannte Funktion	60
At1g33960	AtIAN8/ AtAIG1	biotischer Stress	GTP-bindendes Protein	57
At2g18660	EXLB3	Zellwand	mögliches Expansin	57
At2g14610	AtPR1	biotischer Stress	Regulation der Pathogenantwort	48
At4g28780	-	diverse Gene	GDSL-Typ Lipase	-6
At1g71710	At5P Tase3	"Neben"-CHO-Metabolismus	Inositol-Polyphosphate 5-Phosphatase	-5,9
At4g14130	AtXTR7	Zellwand	Xyloglucan Endotransglucosylase-Hydrolase	-5,8
At1g51940	AtLysM-RLK2	Signalgebung	LysM-Typ Rezeptor-ähnliche Proteinkinase	-5,7
At3g23730	AtXTH16	Fettmetabolismus	Xyloglucan Endotransglucosylase-Hydrolase	-5,2

Keines der am stärksten beeinflussten Gene gehörte zu den Gruppen "Metalltransport" oder "Metallhomöostase". In diesen beiden Gruppen zeigten sich allgemein nur sehr wenige Gene reguliert. In der Gruppe "Metalltransport" war nur *NiCo2* reprimiert (Faktor 4,1), was die RNAi-Induktion bestätigt. Drei Gene, *At-CHX17*, ein möglicher Kationen-Protonen-Transporter, *YSL3*, ein Protein für die Fe-Phytosiderophor-Aufnahme sowie *ZIP11*, eine Zink-Eisen-Permease wurden induziert. Drei weitere, in ihrer Expression verstärkte Gene, gehörten zu der 64 Gene beinhaltenden Gruppe "Metallhomöostase". Hier zeigten sich, neben *AtCOBL5* mit unbekannter Funktion, eine mögliche KlasseI/II-Aminotransferase (*TAT3*) sowie eine Phytochelatin-Synthase (*AT-PCS1*) reguliert (Tabelle 10). Die Gene *PIC1* und die der YGGT-Familie (*At-YGGT-A*, *At-YGGT-B* oder *At-YGGT-C*, vergleiche V.3.1) zeigten nur eine schwache Regulation in ihrem Transkriptgehalt. *PIC1* wurde in seiner Expression in der *nico1/2-dm* schwach reprimiert (FCH 1,2 als nicht signifikant eingestuft, "p-value" 0,058). Von den Genen der YGGT-Familie, welche in dem selben chloroplastidären Metalltranslocon vermutet werden (siehe unten), zeigte nur *At-YGGT-C* einen leichten Expressions-rückgang (FCH = -1,36, "p-value" 0,007). *At-YGGT-A* ist nicht auf dem ATH1-GeneChip und *At-YGGT-B* zeigte keine Beeinflussung.

Tabelle 10: In der *nico1/2-dm* regulierte Gene aus Metalltransport und -homöostase

Von den in den funktionellen Gruppen "Metalltransport" und "Metallhomöostase" induzierten und reprimierten Genen sind deren AGI-Code, der Name, die Funktion, sowie deren durchschnittliche Signalstärke in den Mutanten (Mu) sowie in den Wildtyp-Linien (WT) und der Faktor der Regulation (FCH) angegeben.

AGI-Code	Name	Gruppe	Funktion	Mu	WT	FCN
At4g23700	AtCHX17	Metalltransport	möglicher Kationen-Protonen-Transporter	194	60	3,2
At5g53550	YSL3	Metalltransport	Phytosiderophor-Aufnahme	545	206	2,6
At1g55910	ZIP11	Metalltransport	Zink/Eisen-Permease	1116	450	2,5
At2g24850	TAT3	Metallhomöostase	mögliche Klasse I/II Aminotransferase	171	17	10,2
At5g60950	AtCOBL5	Metallhomöostase	unbekannte Funktion	292	86	3,4
At5g44070	AtPCS1	Metallhomöostase	Phytochelatin-Synthase	956	461	2

V.2.7.6. Phänotyp der *nico1/2-dm* unter verschiedenen Lichtbedingungen

14 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen der *nico1/2-dm* wurden auf Medium mit induzierenden Bedingungen (+ 10µM Dexamethason) und nicht induzierende Bedingungen (ohne Dexamethason) umgesetzt und phänotypische Veränderungen bei Normallicht (100µmol m⁻² s⁻¹; 16h Licht, 8h Dunkel), Schwachlicht (10µmol m⁻² s⁻¹; 16h Licht, 8h Dunkel) sowie Dauerlicht (100µmol m⁻² s⁻¹; 24h Licht) nach sieben Tagen verglichen (Abbildung 24).

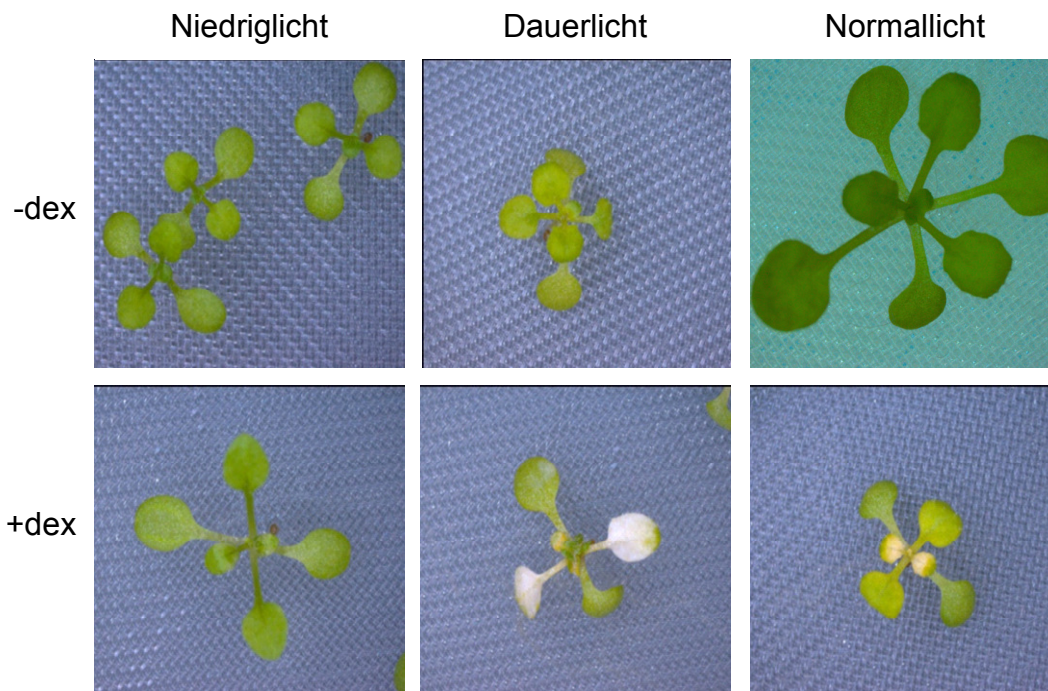


Abbildung 24: Phänotyp der *nico1/2-dm* unter verschiedenen Lichtbedingungen

14 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen der *nico1/2-dm* wurden auf induzierendem (10µM Dexamethason, +dex) und nicht induzierendem Medium (-dex) überführt und unter Schwachlicht (10µmol m⁻² s⁻¹; 16h Licht, 8h Dunkel), Normallicht (100µmol m⁻² s⁻¹; 16h Licht, 8h Dunkel) sowie Dauerlicht (100µmol m⁻² s⁻¹; 24h Licht) weiter angezogen. Phänotypische Veränderungen sind nach sieben Tagen festgehalten.

Der chlorotische Phänotyp, den die *nico1/2-dm* unter Normallicht aufzeigt (Abbildung 24C und Abbildung 22C), war unter Schwachlicht nicht mehr vorhanden (Abbildung 24A). Im Gegensatz dazu wird der chlorotische Phänotyp unter Dauerlicht verstärkt (Abbildung 24B). Erste Untersuchungen ergaben, dass die Zugabe von Eisen (bis 500µM Fe-EDTA) in das Medium die Ausprägung des Phänotyps unter den verschiedenen Lichtbedingungen nicht beeinflussen konnte. Bei Dauerlicht und unter Eisenmangel (+300µM Ferrozin) zeigte sich allerdings eine leicht schwächere Ausprägung des chlorotischen Phänotyps (nicht gezeigt).

V.2.7.7. NiCo-Überexpressionspflanzen in *Arabidopsis*

Der Verlust der beiden Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 in der *nico1/2-dm* hatte einen starken, chlorotischen Phänotyp zur Folge. Aus diesem Grund sollten *Arabidopsis*-Pflanzen mit erhöhter At-NiCo1- sowie At-NiCo2-Expression generiert werden um weitere Möglichkeiten zur Untersuchung des Einflusses beider Proteine auf die Pflanzenentwicklung zu bieten.

Durch Agrobakterien vermittelte, stabile Transformation von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col-0) mit der At-NiCo1- bzw. At-NiCo2-cDNA, unter Kontrolle des mit Dexamethason induzierbaren Promotors "pOp6", wurden für beide Proteine Überexpressionspflanzen erzeugt. 20 unabhängige T2-Linien der NiCo1- sowie acht unabhängige T2-Linien der NiCo2-Überexpressionspflanzen konnten anschließend selektiert werden. Die Linien #3, #9, #10, #12 und #18 der selektierten NiCo1-Überexpressionspflanzen wurden in die dritte Generation (T3) weiter vermehrt. Für die Analyse des *At-NiCo1*-Transkriptgehaltes in den Linien #3 und #12 wurden Samen der T3-Generation auf Kanamycin-haltigem Medium ausgebracht und auf homo- bzw. heterozygotes Selektionsverhalten, im Bezug auf das pOp6::At-NiCo1ox-Konstrukt, selektiert. Die selektierten, 14 Tage alten, homo- oder heterozygoten Keimlinge wurden auf induzierendes (10µM Dexamethason) sowie auf nicht induzierendes Medium überführt. Nach sieben Tagen wurde aus kompletten, induzierten Keimlingen RNA isoliert und mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR der *NiCo1*-Transkriptgehalt analysiert (Abbildung 25).

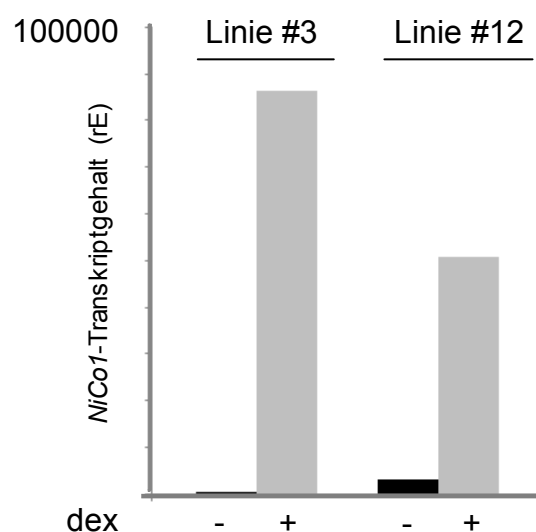


Abbildung 25: *At-NiCo1*-Transkriptgehalt der Überexpressionslinien #3 und #12

Quantifizierung des *At-NiCo1*-Transkriptgehalts in 21 Tage alten, sieben Tage induzierten (+dex) und nicht induzierten (-dex) *NiCo1*-Überexpressionspflanzen der Linien #3 und #12 mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR (n=1; ohne SA), normiert auf 10.000 PRAT3-Transkripte.

Der Vergleich des *At-NiCo1*-Transkriptgehaltes von induzierten (+dex) gegenüber dem von nicht induzierten Überexpressionspflanzen (-dex) der Linie #3 sowie Linie #12 zeigt einen Anstieg um den Faktor 100 bzw. Faktor 20. Bei phänotypischen Untersuchungen unter Standardbedingungen konnten allerdings keine Unterschiede zu Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden. Eine Untersuchung auf Proteinebene konnte aufgrund der zu geringen Sensivität des Peptidantikörpers α -*At-NiCo1* bisher nicht durchgeführt werden. Für die Analyse der *At-NiCo2*-Überexpressionspflanzen, wurden T2-Samen der Linie #8 auf Kanamycin-haltigem Medium auf homo- bzw. heterozygotes Selektionsverhalten, in Bezug auf das pOp6::*AtNiCo2ox*-Konstrukt, selektiert. Nach 14 Tagen wurden die selektierten Keimlinge auf induzierendes (+10 μ M Dexamethason) sowie auf nicht induzierendes Medium überführt. Zehn Tage nach Induktion wurden aus den Keimlingen Proteine extrahiert, diese über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem gegen das *At-NiCo2*-Protein spezifischen Peptidantikörper α -*At-NiCo2* immunodetektiert (Abbildung 26).



Abbildung 26: *At-NiCo2*-Proteingehalt in den *At-NiCo2*-Überexpressionspflanzen

80 μ g Protein eines Proteinextraktes von induzierten (+10 μ M Dexamethason) und nicht induzierten (-dex) *At-NiCo2*-Überexpressionspflanzen der Linie #8 wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunodetektion erfolgte anschließend mit dem spezifisch gegen *At-NiCo2* gerichteten Peptidantikörper α -*At-NiCo2*. Das Molekulargewicht des Proteingrößenstandards ist in Kilodalton angegeben.

Im Proteinextrakt aus induzierten *At-NiCo2*-Überexpressionspflanzen konnte, im Gegensatz zu dem aus nicht induzierten Pflanzen, das Protein *At-NiCo2* auf der Höhe von etwa 31kDa detektiert werden. Dies zeigt, dass zehn Tage nach Induktion eine Überexpression des *At-NiCo2*-Proteins in der Linie #8 vorliegt. Zudem wurde belegt, dass der Antikörper zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sensitiv genug ist um in einem Proteinextrakt von nicht überexprimierenden Pflanzen *At-NiCo2* zu detektieren.

V.3. Weitere Proteine mit Metalltransport-Funktion im Chloroplasten

Um die Interaktion von PIC1 und NiCo zu bestätigen, wurden zwei unabhängige Immunfällungen durchgeführt. Dazu wurden die spezifisch gegen At-PIC1 bzw. gegen Ps-NiCo gerichteten Antikörper an ProteinsepharoseA gekoppelt und solubilisierte Vesikel der inneren Chloroplasten Hüllmembran mit den gekoppelten Antikörpern inkubiert. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Präimmunsera verwendet. Die gekoppelten Proteine wurden dann von dem Antikörper gelöst, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber angefärbt (Abbildung 27). Prominente Proteinbanden, welche nicht vom Präimmunserum gefällt wurden, wurden ausgeschnitten und im "Zentrallabor für Proteinanalytik" (AG Imhof, LMU München) durch Massenspektrometrie sequenziert. Eine gegenseitige Fällung der Proteine PIC1 und NiCo konnte leider nicht gezeigt werden. Allerdings konnte jeweils in den Immunfällungen mit dem gegen At-PIC1, sowie mit dem gegen Ps-NiCo spezifischen Antikörper, auf der Laufhöhe von ca. 13kDa (Abbildung 27) das Protein YGGT aus Erbsen identifiziert werden.

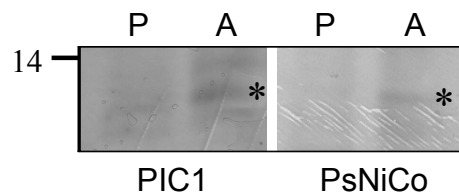


Abbildung 27: Immunfällungen mit PIC1 und NiCo spezifischen Antikörpern

Isolierte Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran (entsprechend 70µg Protein) aus Erbsen-Pflanzen wurden mit 0,5% Dodecylmaltosid solubilisiert und in zwei unabhängigen Ansätzen mit an ProteinsepharoseA gekoppelten, gegen At-PIC1 bzw. Ps-NiCo gerichteten Antikörpern, inkubiert. Die an die Antikörper gebundenen Proteinkomplexe wurden eluiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt. In beiden Ansätzen wurde eine Bande bei ca. 13kDa sequenziert (Stern). Das Molekulargewicht des Protein-Größenstandards ist in Kilodalton angegeben.

V.3.1. Die Familie der YGGT-Proteine

In der Familie der YGGT-Proteine ("European Molecular Biology Laboratory InterPro accession number" IPR003425) befinden sich drei Proteine aus *Arabidopsis* (At-YGGT-A; At-YGGT-B; At-YGGT-C, Lezhneva *et al.*, 2008). Für alle Proteine wurden eine chloroplastidäre Lokalisation und zwei bzw. drei Transmembrandomänen vorhergesagt (ARAMEMNON, Schwacke *et al.*, 2003). Die Proteine At-YGGT-B und At-YGGT-C sind in einem Aminosäurevergleich dem in der Immunfällung identifizierten YGGT Protein aus

Erbse mit 50,5 bzw. 47,5% und jeweils drei vorhergesagten Transmembrandomänen am ähnlichsten (Tabelle 11).

Tabelle 11: Proteine der YGGT-Familie

Liste der Proteine der YGGT-Familie aus *Arabidopsis* und Erbse. Der zugehörige AGI-Code, die Länge des Proteins in Aminosäuren (AS), die Länge des chloroplastidären Transitpeptids in Aminosäuren (cTP), die Anzahl der Transmembrandomänen (TMD; ChloroP, Emanuelsson *et al.*, 1999), die Anzahl der identischen Aminosäuren zu dem Erbsenprotein Ps-YGGT sowie die Größe des maturen Proteins in Kilodalton sind angegeben.

	AGI-Code	AS	cTP	TMD	zu Ps-YGGT identische AS [in %]	Mature Größe (in kDa)
At-YGGT-A	At5g21920	251	51	2	25,4	21,8
At-YGGT-B	At4g27990	218	83	3	50,5	14,9
At-YGGT-C	At3g07430	232	16	3	47,5	23,3
Ps-YGGT	-	211	69	3	-	15,3

V.3.2. Subzelluläre Lokalisation der YGGT-Proteine

Um eine mögliche Zugehörigkeit von einem oder mehreren Proteinen der YGGT-Familie zu einem Metalltranslocon mit PIC1 und/oder NiCo weiter zu untersuchen, musste zunächst die veröffentlichte Thylakoidlokalisation des At-YGGT-C Proteins (Kabeya *et al.*, 2010) überprüft werden. Hierzu wurden die *Arabidopsis* Proteine At-YGGT-B und At-YGGT-C, welche dem in der Immunfällung identifizierten Erbsenprotein am ähnlichsten sind, C-terminal mit dem Reporter-Protein GFP fusioniert und Agrobakterien vermittelt in Tabak transformiert. Die Lokalisation wurde anschließend in isolierten Mesophyll-Protoplasten mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert (Abbildung 28).

Die Analyse ergab ein ringförmig um den Chloroplasten liegendes GFP-Signal, was darauf schließen lässt, dass At-YGGT-B und At-YGGT-C in den chloroplastidären Hüllmembranen lokalisiert sind.

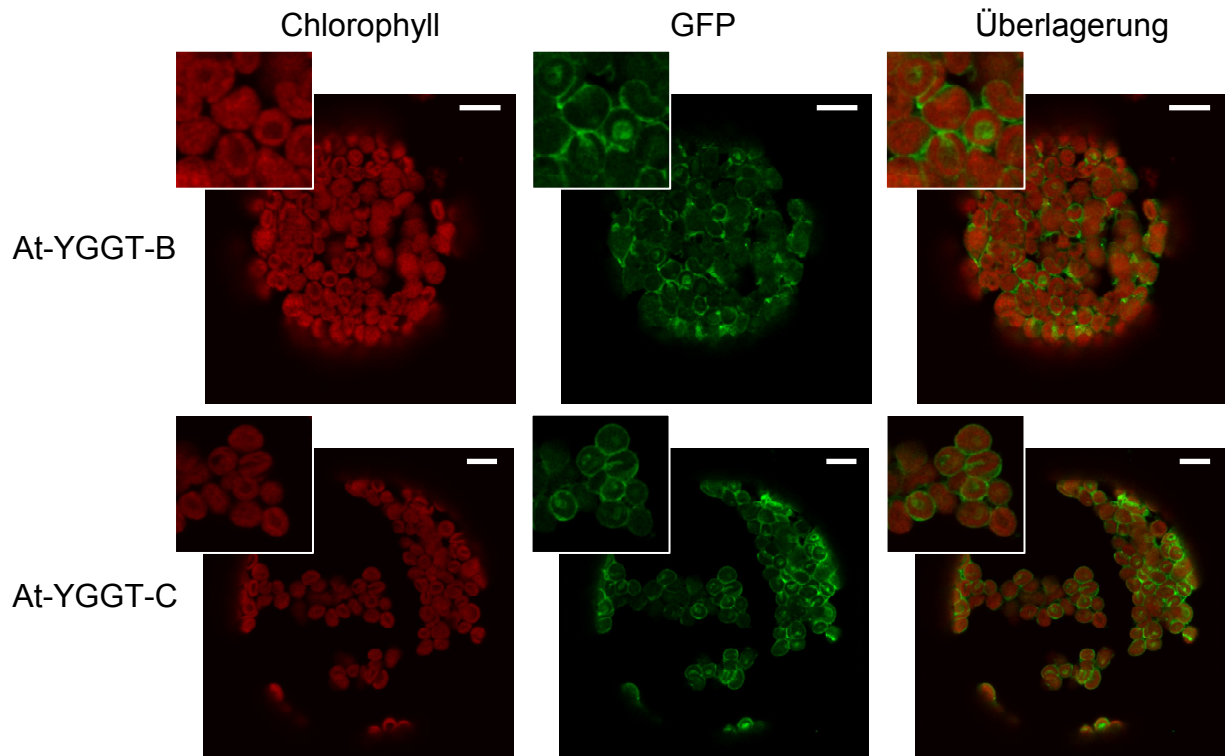


Abbildung 28: Subzelluläre Lokalisation von At-YGGT-B und At-YGGT-C

Die Vorstufenproteine At-YGGT-B und At-YGGT-C wurden C-Terminal an das Reporterprotein GFP fusioniert, Agrobakterien vermittelt in Tabak (*N. benthamiana*) transformiert und anschließend Protoplasten isoliert. Bilder der Chlorophyll-Autofluoreszenz, des GFP-Signals und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Größenstandard entspricht 10µm. Anregungswellenlänge GFP: 488nm, Emissionswellenlänge: 509nm; Mikroskop: Leica TCS SP5.

Die Lokalisation des YGGT-Proteins aus Erbse wurde mit Hilfe von Fraktionen der inneren sowie der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran und der Thylakoidmembranen untersucht. Diese wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotanalyse mit einem gegen Ps-YGGT spezifischen Peptidantikörper untersucht. Der Peptidantikörper ist gegen die Aminosäuren 154 bis 171 des Vorstufen-Proteins gerichtet und wurde von Pineda Antikörperservice (Berlin) hergestellt. Das Erbsenprotein konnte dabei in der Fraktion der inneren chloroplastidären Hüllmembranen auf einer Höhe von ca. 13kDa detektiert werden (Abbildung 29A).

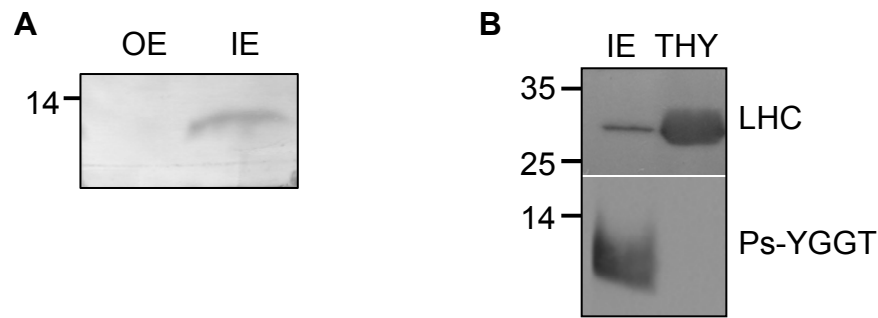


Abbildung 29: Immunoblotanalyse von Ps-YGGT in fraktionierten Chloroplasten

Isolierte Chloroplasten von 14 Tage alten Erbsen wurden in **(A)** äußere (OE) und innere Hüllmembranen (IE) sowie **(B)** innere Hüllmembranen (IE) und Thylakoidmembranen (THY) fraktioniert, gleiche Proteinmengen (10µg) aller Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem spezifisch gegen Ps-YGGT gerichteten Antikörper immunodetektiert. Als Kontrolle wurde Antiserum gegen LHC (Thylakoidmembranen) verwendet. Das Molekulargewicht des Proteingrößenstandards ist in Kilodalton angegeben.

In einer weiteren Immunoblotanalyse wurden Vesikel der inneren chloroplastidären Hüllmembranen sowie der Thylakoidmembranen in einem Glycerin-Shägger-Gel aufgetrennt und mit dem gegen Ps-YGGT gerichteten Antikörper detektiert. Antiserum gegen das in den Thylakoidmembranen lokalisierte Protein LHC wurde als Kontrolle verwendet. Ps-YGGT wurde dabei nur in der Fraktion der inneren chloroplastidären Hüllmembranen und nicht in den Thylakoidmembranen detektiert. Das Kontrollprotein LHC wurde, im Vergleich zu der Thylakoidfraktion, nur schwach in der Fraktion der inneren Chloroplasten-Hüllmembranen nachgewiesen (Abbildung 29B). Dies zeigt auf, dass nur eine geringe Verunreinigung der inneren Chloroplasten-Hüllmembranen mit Thylakoidmembranen vorliegt und bestätigte die Lokalisation des YGGT-Proteins aus Erbsen in den inneren Chloroplasten-Hüllmembranen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der von Kabeya et al. (2010) gezeigten YGGT-C-Lokalisation in den Thylakoiden.

V.4. Die CBY-Proteinfamilie

Der ABC-Transporter Familie CBY (nach Garcia *et al.*, 2004), bestehend aus den zwei löslichen ABC-Proteinen NAP13 (engl.: "non intrinsic ABC protein", ABCI10, At4g33460) und NAP14 (ABCI11, At5g14100), sowie dem Membranprotein CBY (ABCI12, At3g21580) wird eine mögliche Funktion im Metalltransport zugesagt (Shimoni-Shor *et al.*, 2010). Bei der Analyse der T-DNA-Insertionslinien SALK_027270 (*NAP13*; *nap13-1*) und SALK_116866 (*NAP14*; *nap14-1*) (Alonso *et al.*, 2003) zeigten die homozygoten Linien *nap13-1* und *nap14-1* einen ähnlich starken, chlorotischen Phänotyp ähnlich der *pic1-1* Mutante (Duy *et al.*, 2007b). Durch Transformation von *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten mit C-terminalen GFP-Fusionskonstrukten, konnte für NAP13 und NAP14 eine Lokalisation im Stroma und für CBY eine Lokalisation in den Hüllmembranen der Chloroplasten gezeigt werden (Duy, 2009; Voithenberg, 2011). Um die Lokalisation der Proteine der CBY-Familie zu bestätigen, mussten die Proteine für die Antikörpergewinnung überexprimiert werden. Mit den generierten Antikörpern (Pineda Antikörperservice, Berlin) sollte anschließend eine Immunoblotanalyse auf fraktionierten Chloroplasten aus *Arabidopsis* sowie aus Erbse durchgeführt werden.

V.4.1. Gewinnung der rekombinanten Proteine NAP13 und NAP14

Zur Gewinnung von Antikörpern wurden die löslichen Proteine At-NAP13 und At-NAP14 aus *Arabidopsis* in ihrer maturen Form (mNAP13: 24,5kDa; mNAP14: 25,5kDa) überexprimiert und anschließend aufgereinigt. Für die bakterielle, IPTG-induzierte Überexpression wurde jeweils die cDNA des maturen Proteins in den Überexpressionsvektor pet21d subkloniert. Eine Proteinanreicherung im *E.coli* Stamm BL21 konnte in einem Coomassie gefärbten Gel, durch eine in der 3h-Fraktion auftretende Proteinbande in erwarteter Größe, nachgewiesen werden (Abbildung 30A). Anschließend wurden die, über Ni-Sepharose und Elektroelution aufgereinigten Proteine (Abbildung 30B), durch Proteinsequenzierung als NAP13 bzw. NAP14 bestätigt (Zentrallabor für Proteinanalytik, LMU München) und zur Antikörpergewinnung in Kaninchen (Pineda Antikörperservice, Berlin) verwendet.

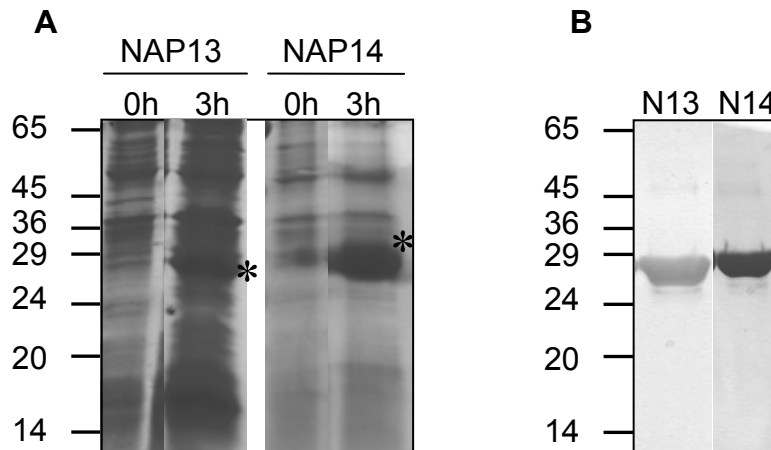


Abbildung 30: Überexpression von NAP13 und NAP14 in BL21 Zellen

Expression des NAP13- und NAP14-Proteins in *E. coli* Zellen des Überexpressionsstammes BL21. **(A)** Aufgetragen sind die Zelllysate vor (0h) und drei Stunden nach (3h) der IPTG-vermittelten Induktion. Eine Bande der Proteinanreicherung bei NAP13 sowie NAP14 ist markiert (Stern). **(B)** Aufgetragen sind 10µg aufgereinigtes Protein NAP13 (N13) und NAP14 (N14). Das Molekulargewicht des Proteingrößenstandards ist in Kilodalton angegeben.

Um zu testen, ob der gegen NAP13 gerichtete Antikörper auch NAP14 und der gegen NAP14 gerichtete Antikörper auch NAP13 detektiert, wurden jeweils 25ng des rekombinanten Proteins in einer SDS-Page aufgetragen und immunodetektiert (Abbildung 31). Es konnte gezeigt werden, dass der gegen NAP14 gerichtete Antikörper NAP13 nicht, der gegen NAP13 gerichtete Antikörper hingegen beide Proteine detektiert.

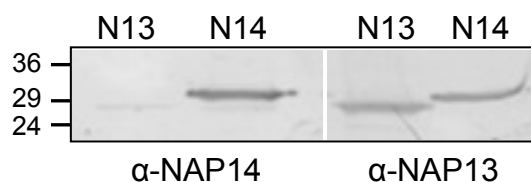


Abbildung 31: Kreuztest der Antikörper zu NAP13 und NAP14

25ng rekombinantes Protein von NAP13 und NAP14 wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit den spezifischen gegen NAP13 bzw. NAP14 gerichteten Antikörpern (α-NAP13; α-NAP14) immunodetektiert. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Da eine Überexpression des maturen Proteins CBY nicht möglich war, wurden Peptidantikörper (Pineda Antikörperservice, Berlin) gegen die *Arabidopsis*- sowie gegen die Erbsen-Isoform bestellt, welche bisher allerdings keine spezifischen Signale detektierten.

V.4.2. Subzelluläre Lokalisation von NAP13 und NAP14

Im Folgenden sollte die durch GFP-Fusion bestimmte Lokalisation der Proteine NAP13 und NAP14 im Stroma von Chloroplasten, durch eine Immunoblotanalyse bestätigt werden. Fraktionen der inneren sowie der äußeren Hüllmembranen, des Stromas sowie der Thylakoidmembranen aus Erbsenchloroplasten sowie Fraktionen der gemischten Hüllmembranen, des Stromas und der Thylakoidmembranen aus *Arabidopsis*-Chloroplasten wurden hierzu mit NAP13 und NAP14 spezifischen Antikörpern immunodetektiert (Abbildung 32).

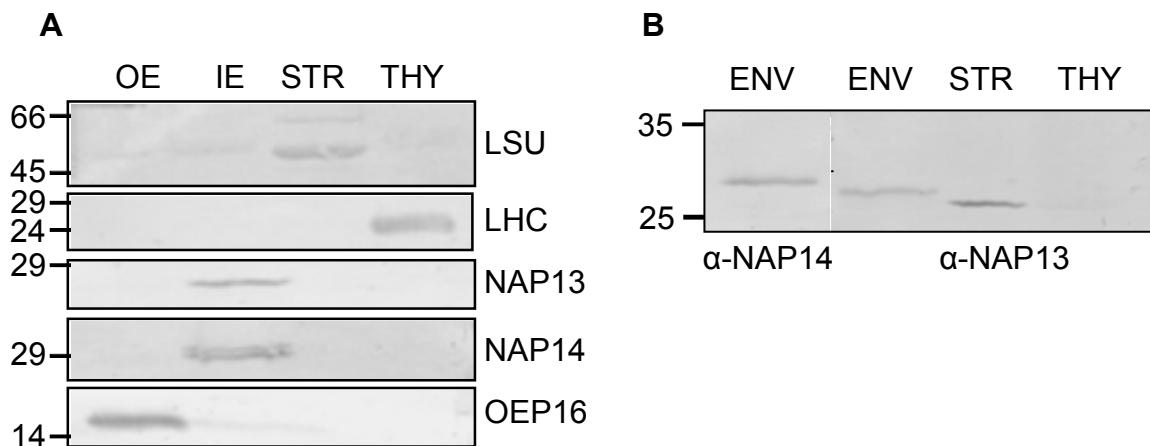


Abbildung 32: Immunoblotanalyse von NAP13 und NAP14 in fraktionierten Chloroplasten

Es wurden Chloroplasten aus Erbse (**A**) sowie aus vier Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen (**B**) in äußere (OE) und innere Hüllmembran (IE) bzw. gemischte Hüllmembranen (ENV) sowie Stroma (STR) und Thylakoidmembranen (THY) fraktioniert und anschließend gleiche Mengen (entsprechend 10µg Protein) aller Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunodetektion von NAP13 und NAP14 erfolgte mit dem jeweils spezifischen Antikörper gegen das mature Protein aus *Arabidopsis*. Antiseren gegen die Markerproteine LSU (Stroma), LHC (Thylakoidmembranen) und OEP16 (äußere Hüllmembran) wurden als Kontrollen verwendet. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in Kilodalton angegeben.

Bei der Immunoblotanalyse konnten die Proteine NAP13 sowie NAP14, entgegen der *in vivo* GFP-Lokalisation im Stroma von Chloroplasten, in der Fraktion der inneren Hüllmembran detektiert werden. NAP13 wurde auf einer Höhe von ca. 28kDa und NAP14 mit einer Doppelbande auf ca. 29,5kDa erkannt (Abbildung 32A). Bei der Lokalisation in *Arabidopsis* wurde das Protein NAP14 in der Fraktion der gemischten Hüllmembranen bei ca. 30,5kDa lokalisiert (Abbildung 32B). Die Detektion von NAP13 zeigte eine Bande in Hüllmembranen bei ca. 29,5kDa sowie eine weitere Bande in der Fraktion des Stromas bei ca. 28kDa. Ein Vergleich aller drei Proteinbanden zeigte, das NAP14 eine höhere Laufhöhe hat, als die mit dem gegen NAP13 gerichteten Antikörper detektierte Proteinbande in den Hüllmembranen

bei ca. 29,5kDa. Die mit α -NAP13 detektierte Proteinbande in der Stroma Fraktion konnte auf 28kDa bestimmt werden und weist somit die erwartete Laufhöhe für NAP13 auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in *Arabidopsis* die in den Hüllmembranen mit α -NAP13 erkannte Proteinbande ein unspezifisches Signal darstellt und NAP13 im Stroma detektiert wird.

V.4.3. Membranassoziation von NAP13 und NAP14

Die Immunoblotanalysen zu NAP13 und NAP14 zeigten eine Detektion der Proteine in der inneren Hüllmembranfraktion, was eine Bindung an ein in der inneren Hüllmembran verankertes Protein vermuten lässt. Um die Stabilität der Bindung der Proteine NAP13 und NAP14 an die innere Hüllmembran zu untersuchen, wurden Vesikel der inneren chloroplastidären Hüllmembranen aus Erbse in vier unabhängigen Ansätzen mit Hochsalzpuffer (1M NaCl), mit einem Puffer mit hohem pH-Wert (Na_2CO_3 , pH 11,3), mit Harnstoff (8M) sowie mit dem Detergenz Triton (1%) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden durch Zentrifugation die durch die Behandlung gelösten, und die weiterhin an den Hüllmembranen gebundenen bzw. in den Membranen verankerten Proteine, in Überstand (Ü) und Pellet (P) separiert. Nach der Auftrennung in einer SDS-PAGE erfolgte die Detektion mit den gegen NAP13 bzw. NAP14 gerichteten Antikörpern (Abbildung 33).

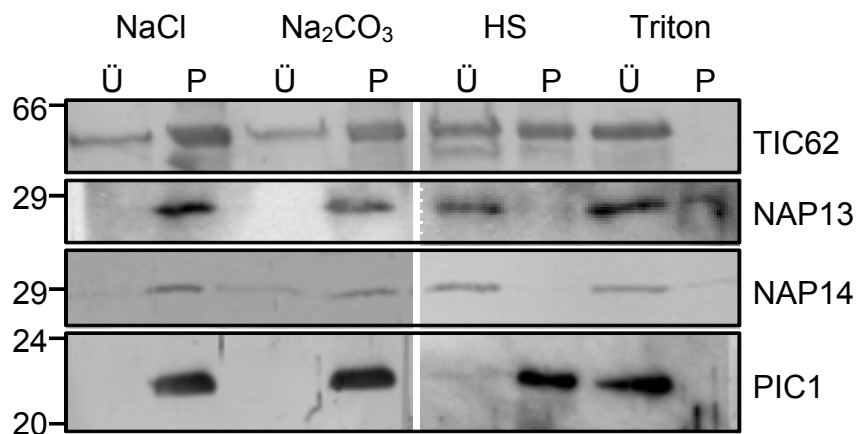


Abbildung 33: Membranassoziation von NAP13 und NAP14

Gleiche Mengen (entsprechend 20 μ g Protein) isolierter Vesikel der inneren Chloroplasten-Hüllmembran aus Erbse wurden in Hochsalzpuffer (1M NaCl), Puffer mit hohem pH-Wert (Na_2CO_3 , pH 11,3), Harnstoff (8M) und Triton (1%) für 20 Minuten auf Eis inkubiert, durch Zentrifugation in Pellet und Überstand separiert und in einer SDS-Page aufgetrennt. Die Proteine NAP13 und NAP14 sowie die Kontrollproteine PIC1 und TIC62 wurden mit den jeweiligen, spezifischen Antikörpern detektiert. Das Molekulargewicht des Protein-größenstandards ist in Kilodalton angegeben.

Nach der Behandlung der inneren Hüllmembranen mit Hochsalzpuffer oder mit alkalischem Puffer (Na_2CO_3 , pH11,3) wurden NAP13 sowie NAP14 in der Pellet-Fraktion, welche die Hüllmembranen enthält, detektiert. Dies deutet auf eine stabile hydrophobe Bindung an ein in der Membran verankertes Protein hin. Im Vergleich wird das Kontrollprotein TIC62, welches auch durch Proteininteraktion an die Hüllmembran gekoppelt ist, durch beide Puffer teilweise gelöst. Bei der Behandlung mit Harnstoff wurde das spezifische Signal bei beiden NAP-Protein in der löslichen Fraktion nachgewiesen. Im Vergleich wurde das die Membran durchspannende Protein PIC1 weiterhin in dem Pellet detektiert. Daher lässt sich schlussfolgern, dass NAP13 und NAP14 durch starke hydrophobe Wechselwirkungen, mit einem in die Membran verankerten Protein, an die innere Hüllmembran gebunden sind.

V.4.4. Nachweis einer Interaktion von CBY und NAP13

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die löslichen Proteine NAP13 und NAP14 über eine mögliche Proteininteraktion an die innere chloroplastidäre Hüllmembran gebunden sind. Ein potentieller Interaktionspartner könnte das aus der gleichen Familie stammende Membranprotein CBY sein. Lena Voitenberg führte im Rahmen Ihrer Diplomarbeit eine Immunfällung mit den gegen NAP13 sowie den gegen NAP14 gerichteten Antikörpern durch. Das Protein CBY konnte in der Immunfällung mit dem gegen NAP13 gerichteten Antikörper nachgewiesen werden (Voithenberg, 2011). In dem anschließenden *in vivo* BIFC-Interaktionstest konnte ein zweiter Nachweis dieser Interaktion leider nicht erbracht werden. Aus diesem Grund sollten NAP13 und CBY, C-terminal an Reporter-Proteine fusioniert, gleichzeitig in Tabakzellen exprimiert werden. Eine Interaktion würde eine Änderung des NAP13-Signals im Stroma, hin zur einem Hüllmembransignal, zur Folge haben.

Um eine gemeinsame Expression in Tabakzellen durchzuführen, wurde das Protein NAP13 C-terminal mit dem Reporter-Protein YFP (engl.: "yellow fluorescence protein") und das Protein CBY C-terminal mit dem Reporter-Protein CFP (engl.: "cyan fluorescence protein") fusioniert. Zunächst wurden beide Konstrukte getrennt, durch Agrobakterien vermittelt, in Tabak transformiert. Bei der Analyse des CBY-CFP-Fusionskonstruktes konnten nur sehr schwache Signale detektiert werden. CBY wurde daher, für die subzelluläre Lokalisation, C-terminal mit GFP-fusioniert. Durch ein ringförmiges GFP-Signal um den Chloroplasten, konnte die Lokalisation in den Hüllmembranen bestätigt werden (Abbildung 34A). Die Analyse des NAP13-YFP-Signals zeigte die nach Duy, 2009 erwartete Stromalokalisation (Abbildung 34B). Bei der gleichzeitigen Expression des NAP13-YFP- mit dem CBY-CFP-Fusionskonstrukt, zeigte das YFP-Signal von NAP13 eine Lokalisation in der Chloroplasten-

Hüllmembran (Abbildung 34C). Diese Änderung des NAP13-YFP-Signals von einem Stroma-Signal hin zu einem Hüllmembran-Signal ist, neben der Fällung von CBY in einer gegen NAP13 gerichteten Immunfällung (Voithenberg, 2011), ein weiterer Nachweis einer Interaktion beider Proteine.

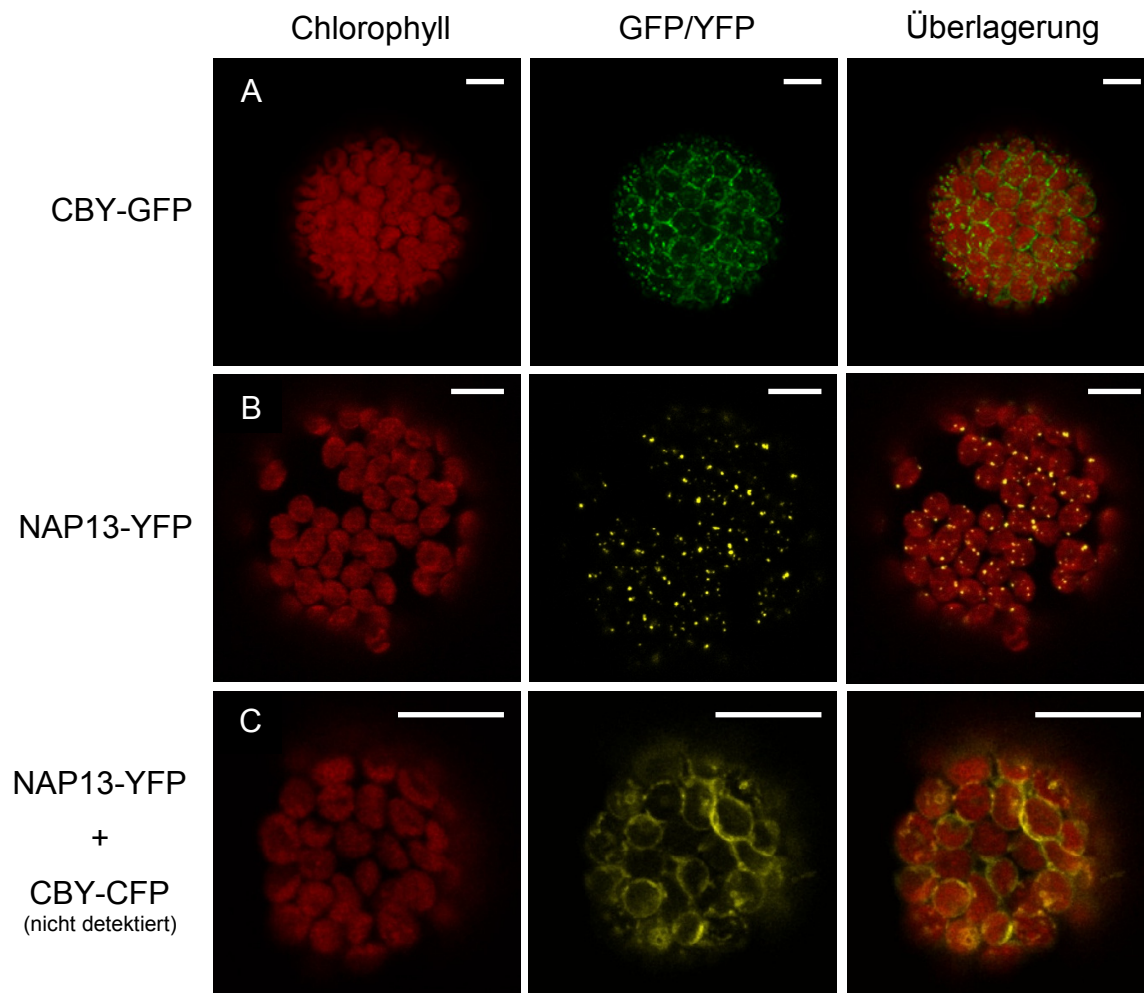


Abbildung 34: *in vivo* Interaktion von NAP13 und CBY

Die C-terminalen Fusionskonstrukte der Vorstufenproteine CBY-GFP **(A)** und NAP13-YFP **(B)** sowie eine Kombination aus dem CBY-CFP und NAP13-YFP **(C)** wurden Agrobakterien vermittelt in Tabak transformiert. Anschließend wurden Protoplasten isoliert und die GFP/YFP-Signale mittels eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops detektiert. Bilder der Chlorophyll-Autofluoreszenz, der GFP/YFP-Signale und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Größenstandard entspricht 10µm. Anregungswellenlänge GFP: 488nm, YFP: 514nm, Emmisionswellenlänge GFP: 509nm, YFP: 527nm; Mikroskop: Leica TCS SP5.

Das CFP-Signal des CBY-Fusionskonstruktes konnte leider in keiner gemeinsamen Expression detektiert werden. Auch eine gemeinsame Expression des NAP13-YFP- und des CBY-GFP-Fusionskonstrukts konnte, aufgrund der zu ähnlichen Emmisionswellenlängen nicht durchgeführt werden.

VI. DISKUSSION:

Metalltranslocon-Komplexe in Chloroplasten

In allen Organismen, vom Einzeller über Bakterien und Pflanzen bis hin zum Menschen müssen Moleküle und Substanzen wie z.B. Aminosäuren, Hormone, Lipide sowie auch Metalle über biologische Membranen transportiert werden. Diese Funktion erfüllen neben anderen Kanälen und Carriern die ABC-Transporter, eine große und diverse Proteinfamilie (Verrier *et al.*, 2008). Das in den vorherigen Arbeiten identifizierte Protein PIC1 wurde als eine transmembrane Domäne eines chloroplastidären Metalltransporters beschrieben und eine Ähnlichkeit zu ABC-Transporter-Permeasen festgestellt (Duy *et al.*, 2007b). Die Basis eines jeden ABC-Transporters besteht aus transmembranen Domänen (TMD) sowie löslichen Einheiten, den Nucleotid-Bindedomänen (NBD; engl.: "nucleotide binding domain"). Die häufigste Kombination in einem ABC-Transportersystem sind jeweils zwei TMDs (klassische Permease-Domänen) und zwei NBDs (Verrier *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011). Die TMDs bestehen aus vier bis acht α -Helices und übernehmen die Funktion in Substrattransport und Erkennung sowie Bindung der löslichen Untereinheiten. Die Funktion der löslichen NBDs ist die ATP-Hydrolyse. Somit bilden sie die energetisierenden Einheiten eines ABC-Transporters (Higgins, 2001; Higgins und Linton, 2004). Mögliche Anhaltspunkte für die Struktur eines chloroplastidären Eisentransporters bieten die, oftmals besser charakterisierten, prokaryotischen ABC-Transportersysteme. Ein gutes Strukturmodell bieten die Nickel/Kobalt transportierenden NikABCDE- bzw. CbiM(N)QO-Systeme aus *E.coli* (siehe auch Abbildung 37). Diese sind mit einer Zusammensetzung aus drei TMDs und einer NBD beschrieben, wobei eine TMD jeweils die Permease-Domäne mit 4-5 Membranhelices repräsentiert (Navarro *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 1993). Die in dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen Proteine der NiCoT-Familie könnten somit, neben PIC1, eine zweite TMD des chloroplastidären Eisentranslocons darstellen. Mitglieder der NiCoT-Familie aus prokaryotischen Organismen sind als Nickel und/oder Kobalt transportierende und bindende Proteine beschrieben (Eitinger *et al.*, 2005). Somit liegt es nahe, dass die pflanzlichen Proteine der NiCoT-Familie auch eine Funktion im Metalltransport bzw. in einem Metalltranslocon haben und sich in dieses als TMD einfügen. Dies in Betracht gezogen, können die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu einem Modell eines chloroplastidären eisen-transportierenden Transporter-Komplex zusammengefügt werden (vergleiche Abbildung 37).

VI.1. Molekulare Interaktionen - PIC1, NiCo und YGGT

Für die Suche nach PIC1-Interaktionspartnern wurde das Hefe-Spit-Ubiquitin-System ausgewählt. In einer ersten Interaktionsstudie konnte die bereits in einer Blau-Nativen-Gelelektrophorese gezeigte Homooligomerisierung von PIC1 (Duy, 2009) in Hefe bestätigt werden. In Anlehnung an ABC-Transportsysteme und andere Membrantransporter ist die Homooligomerisierung der membranständigen Proteine notwendig. Diese konnte für PIC1 zudem auch noch mit Hilfe des BiFC-Systems in Tabakprotoplasten *in vivo* nachgewiesen werden. PIC1 erfüllt somit eine wichtige Eigenschaft, um als membranständige Domäne in einem Metalltranslocon zu dienen. Einen weiteren Aufschluss über den Mechanismus der Proteininteraktion ergab die Untersuchung einer TonB-Box-Domäne von PIC1. Diese annotierte Domäne umfasst die Aminosäuren 1 - 58 des maturen PIC1-Proteins und ist in prokaryotischen Fe-Transportsystemen als Interaktionsdomäne beschrieben (z.B. Larsen *et al.*, 1997). Das Entfernen der TonB-Domäne bzw. die Mutation der für die Funktionalität als essentiell beschriebenen Aminosäure Valin an Position 43 führte zu einem Verlust der Interaktionsfähigkeit von PIC1 im Split-Ubiquitin-System. Durch dieses Ergebnis lässt sich auf weitere Parallelen zu prokaryotischen Transportern schließen und die Funktion von PIC1 in einem Metalltranslocon in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran wird untermauert. Als Beispiel des TonB-Box-Mechanismus kann der Eisen-Zitrat-Transporter FecA herangezogen werden, um die Funktionalität des Proteins und der TonB-Box-Domäne vereinfacht darzustellen (Abbildung 35).

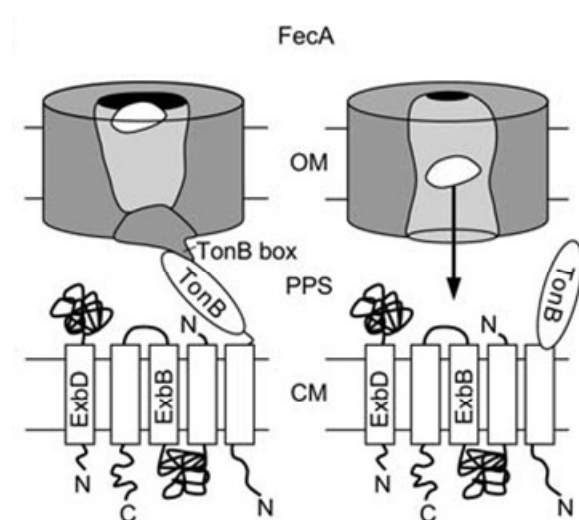


Abbildung 35: Eisen - Zitrat - Transporter FecA aus *E. coli*

Vereinfachte Darstellung des Mechanismus des Eisen-Zitrat-Transporters FecA aus *E. coli* (Duy *et al.*, 2007a). Links: Im Ruhestadium des Transporters blockiert die N-terminale TonB-Box-Domäne den Kanal. Bindet Fe^{III}-Zitrat den FecA-Rezeptor findet eine, durch Konformationsänderung ermöglichte Interaktion mit dem TonB-Protein statt. Rechts: Eine interaktionsbedingte Konformationsänderung des FecA-Rezeptors führt zur Schließung der Ligandenbindestelle und zur Freigabe des, durch die TonB-Box blockierten Transporters. Fe^{III}-Zitrat wird transportiert. OM: Äußere Membran (engl.: "outer membrane"), PPS: periplasmatischer Raum (engl.: "periplasmatic space"), CM: Cytoplasmamembran

Sollte ein ähnlicher Mechanismus bei PIC1 und dem entsprechenden Metalltranslocon vorliegen, gilt es zukünftig nicht nur weitere Interaktionsproteine zu finden, sondern auch mögliche Substrate des Translocons zu identifizieren, sowie den genauen Mechanismus des Transports zu entschlüsseln.

In dem Screen im Split-Ubiquitin-System konnten 98 mögliche Interaktionsproteine für die Eisenpermease PIC1 identifiziert werden. Allerdings hatten nur 37 der 98 Proteine eine vorhergesagte Lokalisation im Chloroplasten. Die große Anzahl, der offensichtlich fälschlich als mögliche Interaktionspartner identifizierten Proteine, könnte mehrere Gründe haben. Der durchgeführte Screen wurde gegen eine cDNA-Datenbank und somit gegen die Vorstufenproteine durchgeführt. Somit könnten unspezifische Interaktionen von den Transitpeptiden vermittelt worden sein. Die Erstellung der 98 Proteine umfassenden Liste möglicher Interaktionspartner von PIC1 basierte zudem auf einer Blau/Weis-Farbentwicklung getesteter Interaktionsansätze. Bei einer Auswertung nach der Kolonienanzahl auf den Selektionsplatten im Vergleich zu den Kontrollplatten, sind jedoch laut Protokoll des Hefe-Split-Ubiquitin-Systems, Interaktionen, die zu einem Hefewachstum von unter 20% führen, als negativ zu bewerten. Diese Gewichtung nach Stärke der Interaktion ist durch eine Auswertung nach einer Blau/Weis-Farbentwicklung nicht möglich. Aus den 37 Proteinen mit vorhergesagter, chloroplastidärer Lokalisation, wurden schließlich drei Proteine (#32, #59, At-NiCo1 = #63a), durch einen selbst durchgeführten Hefe-Split-Ubiquitin-Test und Auswertung nach der 20%-Regel, als aussichtsreiche Interaktionspartner von PIC1 identifiziert. Zusammen mit dem zu At-NiCo1 homologen Protein, At-NiCo2, wurden diese vier Proteine weiter untersucht.

VI.1.1. NiCo-Proteine

In den folgenden Lokalisationsstudien mit den mit GFP fusionierten Proteinen #32 und #59 konnten keine spezifischen Signale detektiert werden. At-NiCo1 und At-NiCo2 jedoch zeigten in *Arabidopsis* sowie in Tabak eine deutliche Lokalisation in den chloroplastidären Hüllmembranen (Abbildung 12). Aus diesem Grund lag nun die Konzentration auf den Proteinen At-NiCo1 und At-NiCo2 sowie auf deren Ortholog aus Erbse (Ps-NiCo). Li *et al.* (2010) beschrieb bereits das NiCo-Protein aus Reis als ZEBRA-NECROSIS Protein und lokalisierte es in den Thylakoiden. In Immunoblot-Studien im Rahmen meiner Arbeit konnte die Lokalisation der Proteine At-NiCo1, At-NiCo2 sowie Ps-NiCo allerdings in der inneren Hüllmembran bestätigt und eine Lokalisation in den Thylakoiden ausgeschlossen werden (Abbildung 13). Die Signale beider Proteine aus *Arabidopsis* zeigten eine erwartete Laufhöhe

von ca. 30kDa (At-NiCo1) bzw. 31kDa (At-NiCo2). Die Laufhöhe des Ps-NiCo-Proteins auf ca. 28kDa entspricht nicht ganz der vorhergesagten Größe des maturen Proteins von 33,1kDa. Dies kann allerdings auf das Laufverhalten in einer SDS-PAGE zurückzuführen sein. Auch die tatsächliche Größe des chloroplastidären Transitpeptids (cTP) ist bisher nicht experimentell bestimmt. Das cTP des Ps-NiCo-Proteins könnte eine ähnliche Größe wie das der Proteine aus *Arabidopsis* haben und somit entgegen der Vorhersage länger sein. Die Spezifität des Antikörpers gegen At-NiCo1 und die Laufhöhe der Banden konnte durch eine Immunoblotanalyse auf chloroplastidären Hüllmembranen aus der *nico1-1*-Mutante bestätigt werden (Abbildung 20). Somit konnte gezeigt werden, dass das detektierte Signal auch tatsächlich dem At-NiCo1-Protein entspricht und keine Kreuzerkennung mit At-NiCo2 stattfindet. Aufgrund der zu geringen Sensitivität des gegen At-NiCo2 gerichteten Antikörpers, konnte dieser Nachweis bisher für α -At-NiCo2 noch nicht erbracht werden. Eine generelle Funktionalität des α -At-NiCo2-Antikörpers konnte allerdings auf Proteinextrakte aus At-NiCo2-Überexpressionspflanzen gezeigt werden (siehe Abbildung 26). Alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen eine Lokalisation sowie Integration der NiCo-Proteine in der inneren chloroplastidären Hüllmembran auf.

Der Stammbaum der NiCoT-Familie zeigt, dass es in den Landpflanzen manchmal ein und manchmal zwei orthologe Proteine gibt. Es liegt die Vermutung nahe, dass sofern eine Spezies zwei NiCo-Proteine besitzt, diese eine sich komplementierende Funktion besitzen. Diese Vermutung wurde in *Arabidopsis* bestätigt, da erst ein Verlust beider Proteine einen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung zeigte. In Reis allerdings, welcher ebenso wie *Arabidopsis* zwei NiCo-Proteine besitzt, wurde ein nekrotischer Phänotyp durch den Verlust nur eines Proteins gezeigt (Li *et al.*, 2010). Somit bleibt der Zusammenhang, warum Landpflanzen manchmal ein oder zwei Proteine der NiCoT-Familie besitzen, bisher ungeklärt. In allen anderen Spezies wurde immer nur ein NiCoT-Protein gefunden. Zudem ist auffällig, dass Proteine der NiCoT-Familie, anders als PIC1 und seine orthologen Proteine, nicht nur in photosynthetisch aktiven Landpflanzen und Algen vorkommen. NiCoT-Proteine finden sich auch in Pilzen und Bakterien und somit in vielen nicht photosynthetisch aktiven Organismen. Bei den Cyanobakterien sind NiCoT-Proteine entgegen den PIC1 Verwandten gar nur in den marinen Spezies vertreten.

Um die molekulare Interaktion der Proteine PIC1 und NiCo weiter zu untersuchen, musste die Membranorientierung beider Proteine bestimmt werden. Durch den proteolytischen Verdau von Ps-NiCo konnte die Orientierung des C- sowie des N-Terminus in den Intermembranraum festgelegt werden (Abbildung 15). Durch das folgende

"PEGylierungsexperiment" konnte die Orientierung bestätigt werden (Abbildung 16). Außerdem bestätigten beide Versuche ein Proteinmodell mit sechs Transmembrandomänen, im Gegensatz zu dem vorhergesagten Modell von sieben Transmembrandomänen bei pflanzlichen Proteinen aus der NiCoT-Familie (Abbildung 36; Eitinger *et al.*, 2005). Außerdem zeigt das in dieser Arbeit erhaltene Modell bzw. die Lokalisation in der inneren Hüllmembran, dass kein Verdau an der vorhergesagten Schnittstelle durch eine Thylakoid-Peptidase stattfindet und widerlegt die Vorhersage eines Bipeptids, welches die als schwarzer Zylinder dargestellte erste Transmembrandomäne in Abbildung 36 enthält. Auch die Tatsache, dass NiCo-Proteine nicht in Proteomanalysen von Thylakoiden gefunden wurden (pers. Mitteilung von PD Dr. Katrin Philippar) unterstützt die Widerlegung eines Bipeptids bzw. eine Lokalisation in den Thylakoiden.

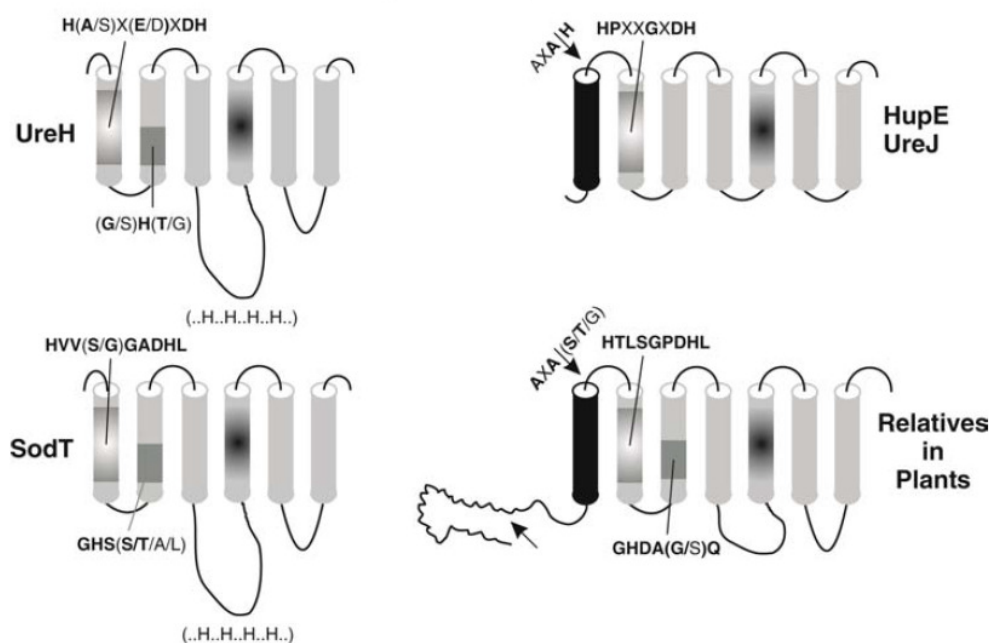


Abbildung 36: Struktur von NiCoT-Proteinen aus Prokaryoten und deren pflanzlichen Verwandten (Eitinger *et al.*, 2005)

Transmembrandomänen sind als Zylinder und deren konservierten Segmente dunkelgrau dargestellt. Konservierte Domänen der Segmente sind eingetragen. Konservierte, cytoplasmatische Peptidschleifen sind gestrichelt gezeichnet. Das für alle NiCoT-Proteine typische Motiv HX_5DH ist in allen Proteinen in der zweiten TMD angegeben. In HupE/UreJ und in den pflanzlichen Proteinen ist ein vorhergesagtes Signalpeptid bzw. thylakoidales Transitpeptid schwarz dargestellt. Die vorhergesagten Schnittstellen für die bakterielle Signal-Peptidase in HupE/UreJ sowie für eine Thylakoid-Peptidase in pflanzlichen Proteinen sind mit diagonal nach unten gerichteten Pfeilen markiert. Eine vorhergesagte Schnittstelle für eine Stroma-Peptidase ist mit einem diagonal nach oben gerichteten Pfeil dargestellt. Histidinreiche Motive in cytoplasmatischen Peptidschleifen sind durch "..H..H..H..H.." hervorgehoben.

Durch ein Modell mit sechs Transmembrandomänen, sowie der Orientierung von N- und C-Terminus in den Intermembranraum, kann die Orientierung der identifizierten HX₅DH-Domäne von NiCo1 und NiCo2, hinein in das Stroma des Chloroplasten festgelegt werden. In Bakterien als HX₄DH-Domäne beschrieben, wurde dieser in Proteinen der NiCoT-Familie eine direkte Ni/Co-Bindefunktion nachgewiesen (Eitinger *et al.*, 1997) und ist charakteristisch für alle Proteine der Familie (Abbildung 36). Die größte Homologie weisen die pflanzlichen NiCo-Proteine zu den bakteriellen NiCo-Proteinen HupE und UreJ auf. Beiden Proteinen wurde eine Funktion im Nickeltransport nachgewiesen (Eitinger *et al.*, 2005)

Die Orientierung von PIC1 konnte ebenfalls durch Proteolyse bestimmt werden. Auch hier zeigten die Ergebnisse, dass C- und N-Terminus in den Intermembranraum ragen. Ein PEGylierungsansatz konnte nicht durchgeführt werden, da PIC1 aus Erbse kein dafür notwendiges Cystein besitzt. Das Ortholog aus *Arabidopsis* besitzt ein Cystein im C-Terminus. Allerdings ist für Hüllmembran-Vesikel aus *Arabidopsis* die Orientierung, im Gegensatz zu den "right-side-out"-orientierten Vesikeln aus Erbse (Keegstra und Youssif, 1986; Waegemann *et al.*, 1992) unklar. Somit bleibt die Proteolyse mit Thermolysin im Moment der einzige, allerdings eindeutige Nachweis der Orientierung von PIC1.

Durch die Bestimmung der Membranorientierung von PIC1 und NiCo konnte gezeigt werden, dass C- und N-Terminus beider Proteine in das Stroma orientiert sind. Somit war die Voraussetzung gegeben, die Interaktion beider Proteine in dem BifC-System in Tabak zu untersuchen. Allerdings wurden bei keinem der kombinierten Ansätze At-PIC1 mit At-NiCo1 oder At-NiCo2 GFP-Signale detektiert. Somit konnte eine Interaktion nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis kann sterische Gründe haben, welche eine Proteininteraktion verhindern. Ein weiterer Grund wäre auch eine mögliche schlechte Funktionalität der NiCo1/2-BifC-Konstrukte. Eine generelle korrekte Expression und Lokalisation der NiCo-Proteine in Tabak wurde allerdings im Zusammenhang mit der Lokalisation GFP-fusionierter NiCo-Proteine gezeigt. Die Expression der BifC-Konstrukte könnte daher noch durch eine Immunoblot-Analyse mit spezifisch gegen den "Flag-Tag" gerichteten Antikörper überprüft werden. Der "Flag-Tag" wird ebenfalls mit den BifC-Konstrukten exprimiert und ist an diese fusioniert. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass ein "Linker"-Protein benötigt wird, welches die Interaktion von PIC1 und NiCo vermittelt. Es wäre denkbar, dass in dem Hefe-Split-Ubiquitin-System dieses Protein für die Interaktion nicht benötigt wird oder ein Hefeprotein vorhanden ist, welches die Linkerfunktion zwischen PIC1 und NiCo übernimmt. Ein Hinweis auf ein mögliches "Linker"-Protein wurde in zwei unabhängigen Immunfällungen auf inneren chloroplastidären Hüllmembranen, mit den spezifisch gegen PIC1 und NiCo gerichteten

Antikörpern, gefunden. Anstatt eine gegenseitige Fällung der Proteine PIC1 und NiCo zu erreichen, wurde in beiden Ansätzen das Protein YGGT aus Erbse (Ps-YGGT) identifiziert.

VI.1.2. YGGT-Proteine

In einer Immunoblotanalyse auf Fraktionen aus Vesikeln der inneren chloroplastidären Hüllmembranen sowie einer Thylakoidfraktion, wurde Ps-YGGT in der inneren, chloroplastidären Hüllmembran, auf der Laufhöhe von ca. 13kDa, detektiert (Abbildung 29). Spezifische Antikörper gegen das in den Thylakoiden lokalisierte Protein LHC (engl.: "light harvesting complex") wurden als Kontrolle verwendet. Somit konnte eine Kontamination der Fraktion der inneren Hüllmembranen mit Thylakoidmembranen ausgeschlossen werden. Laut Vorhersage wurde eine Laufhöhe nach der murenen Größe von ca. 23kDa erwartet (Tabelle 11). Die niedrigere Laufhöhe des Proteins unterstützt allerdings die Vermutung, dass die Vorhersage des chloroplastidären Transitpeptids von nur 16 Aminosäuren nicht korrekt ist. Es ist möglich, dass ein ähnlich langes Transitpeptid wie bei At-YGGT-B vorliegt und dies dann zu der tatsächlichen murenen Größe von ca. 13kDa führt. Die Lokalisation in der inneren chloroplastidären Hüllmembran steht im Gegensatz zu der durch Kabeya *et al.* (2010) bestimmten Thylakoid-Lokalisation des At-YGGT-C Proteins. In der Familie der YGGT-Proteine befinden sich drei Proteine aus *Arabidopsis*: At-YGGT-A, At-YGGT-B und At-YGGT-C mit jeweils drei vorhergesagten Transmembrandomänen. YGGT-A wurde, aufgrund zu großer Unterschiede in der Aminosäurestruktur gegenüber dem in der Immunfällung identifizierten Protein aus Erbse in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Übereinstimmend mit der Lokalisation des Erbsenproteins zeigten die GFP-fusionierten Proteine At-YGGT-B und At-YGGT-C ebenfalls eine Lokalisation in den chloroplastidären Hüllmembranen (Abbildung 28). Dieses Ergebnis wird auch durch Proteomanalysen von Hüllmembranen bestätigt (Rolland *et al.*, 2003, Froehlich *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Kabeya und Mitarbeitern (2010) wurde in dieser Arbeit eine hochauflösende Glycin-SDS-PAGE verwendet. Diese befreit die Thylakoidproteine von einer, in einer normalen SDS-PAGE niedrigmolekular laufenden, Verunreinigung von Lipiden und Pigmenten. Somit wurde einer unspezifischen Reaktion des Antikörpers mit diesen ausgeschlossen. Durch die gezeigte Hüllmembran-Lokalisation erfüllen die YGGT-Proteine eine wichtige Voraussetzung für die Zugehörigkeit zu einem Metalltranslocon zusammen mit PIC1 und/oder NiCo. Zukünftig müssen weitere Bestätigungen einer Interaktion von YGGT mit PIC1 bzw. NiCo erbracht werden. Interaktionsstudien können z.B. in dem etablierten BifC-System in Tabak sowie in dem Hefe-Split-Ubiquitin-System durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang könnte

gleichzeitig untersucht werden, welche der drei YGGT-Proteine aus *Arabidopsis* mit NiCo bzw. PIC1 interagieren. Ein weiterer Ansatz wäre, in einer Blau-Nativen-Gelelektrophorese von inneren Hüllmembranen die Zugehörigkeit von YGGT, PIC1 und NiCo zu ein und demselben Proteinkomplex zu untersuchen. Das tri-molekulare Komplementationssystem (TrifC) könnte ebenso als Ansatzpunkt für den Nachweis einer Komplexbildung aller drei Proteine dienen (Shyu *et al.*, 2008). Dieses System ist vergleichbar mit dem bi-molekularen Komplementationssystem (BifC) und könnte ebenfalls in Tabak durchgeführt werden. Auch der Mechanismus der Interaktion, seitens der Proteine YGGT und NiCo, muss noch genauer untersucht werden. Hier gilt es mögliche Interaktions- Domänen der Proteine zu identifizieren und durch gezielte Mutation deren Funktion nachzuweisen.

Fasst man die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse über Lokalisation, Orientierung und Interaktionen aller drei Proteine zusammen, so können in einem hypothetischen Modell des Metalltranslocons PIC1-YGGT-NiCo, einige Parallelen zu der Vorhersage von Proteinkomplexen für prokaryotische Nickel/Kobalt-ABC-Transportersystemen gezogen werden (Abbildung 37).

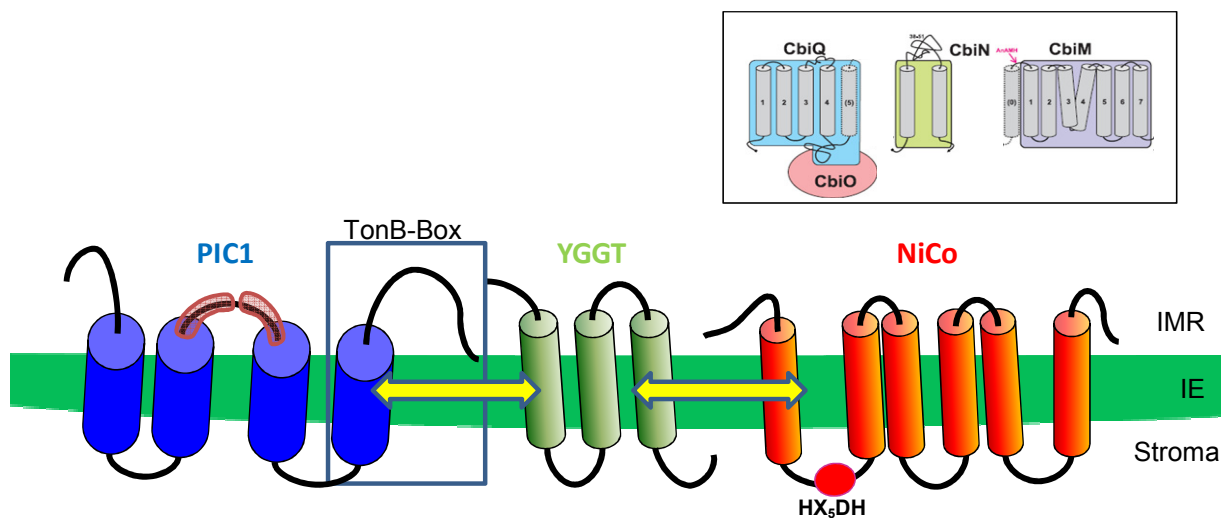


Abbildung 37: Hypothetisches Modell des Metalltranslocons PIC1-NiCo-YGGT

Topologie eines hypothetischen Modells des Metalltranslocons um PIC1, NiCo und YGGT. Vorhergesagte transmembrane Helices sind als Zylinder dargestellt. Die Interaktion der Proteine untereinander ist durch gelbe Pfeile gekennzeichnet. Die zwei vorhergesagten, kurzen α -Helices zwischen der zweiten und dritten Helix von PIC1 sind rot eingrahmt. Kasten oben rechts: Zum Vergleich ist das vorhergesagte Modell des Nickel/Kobalt-ABC-Transportersystems CbiMNQO aus Rodionov *et al.* (2006) dargestellt. IMR: Intermembranraum, IE: innere Chloroplasten-Hüllmembran.

Der ABC-Transporter CbiMNQO aus der CbiMNQO/NikMNQO-Familie (Abbildung 37) besteht aus drei transmembranen Untereinheiten (CbiQ, CbiM, CbiN) und einer löslichen ATPase-Untereinheit (CbiO; Rodionov *et al.*, 2006). Die Untereinheit CbiQ hat eine vorhergesagte Struktur aus vier konservierten, sowie einer möglichen Transmembrandomäne

und besitzt Bindestellen für die lösliche ATPase-Untereinheit CbiO. Diese Topologie ist vergleichbar mit der von PIC1, welches auch vier Transmembrandomänen, sowie zwei lösliche Helices zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne mit einer möglichen Bindefunktion besitzt (Abbildung 37; Duy, 2009). CbiQ stellt zudem die Permease-Untereinheit des CbiMNQO-Systems dar, was wiederum eine Parallele zu PIC1 darstellt. CbiM hat sieben vorhergesagte Transmembrandomänen. Für einige Aminosäure-Motive des Proteins werden Funktionen in der Metallerkennung und Bindung vorhergesagt (Rodionov *et al.*, 2006). Somit weisen Proteine der NiCoT-Familie Übereinstimmungen zu dem CbiQ-Protein auf. CbiQ und CbiM werden als konservierte und konstante Untereinheiten des Transportersystems beschrieben, CbiN hingegen als kleineres, zwei bis drei Transmembrandomänen umfassendes, flexibles Protein. YGGT könnte in einem vergleichbaren Transportersystem, zusammen mit PIC1 und NiCo, diesen Teil darstellen. Dieses Model zu bestätigen, sowie die lösliche Untereinheit, welche laut Vorhersage im Intermembranraum lokalisiert sein müsste, zu identifizieren, bleibt für die Zukunft eine wichtige Aufgabe.

VI.2. Funktionelle Analysen

Der Nachweis einer Eisentransportfunktion konnte bei dem Protein PIC1 z.B. durch Wachstumskomplementation von Hefemutanten (Duy *et al.*, 2007b) sowie durch Messung einer erhöhten Eisenkonzentration in den Chloroplasten von PIC1 überexprimierenden Pflanzen (Duy *et al.*, 2011) erbracht werden. Das in dieser Arbeit als PIC1-Interaktionspartner neu identifizierte Protein NiCo sollte in meiner Arbeit auf dessen Funktion im Metalltransport untersucht werden.

Eine Wachstumskomplementation von dem in der Eisenaufnahme defiziten Hefestamm *fet3fet4* konnte sowohl mit den maturen als auch mit den Vorstufenproteinen At-NiCo1, At-NiCo2 und Ps-NiCo, nicht erreicht werden. Auch die Senkung des pH-Wertes des Mediums, wodurch Eisen für die Hefen besser verfügbar wird, sowie der Zusatz von Eisen in verschiedenen Formen (Fe-EDTA, FeCl₃, Fe-Citrat) konnte keine signifikante Komplementation bewirken. Auch die Komplementation von den Mangan- bzw. Kupferaufnahme defiziten Hefestämmen *smf1* und *ctr1* konnte durch keines der NiCo-Proteine erfolgreich gezeigt werden. Im Gegensatz zu PIC1 konnte somit kein direkter Funktionsnachweis für die pflanzlichen NiCoT-Proteine als metalltransportierendes oder bindendes Protein erbracht werden. Allerdings bleibt zu beachten, dass auch PIC1, im Vergleich zu dem hoch affinen Eisentransporter IRT1, eine schlechtere Komplementation

aufzeigte (Duy *et al.*, 2007b). Somit ist auch die Möglichkeit gegeben, dass wie schon bei PIC1 vermutet, auch die pflanzlichen NiCoT-Proteine nicht richtig oder unvollständig in die Plasmamembran der Hefezellen inseriert werden. Allerdings wurde für einige Proteine der NiCoT-Familie aus prokaryotischen Organismen, z.B. Nic1p aus der Hefe *S. pombe*, ein Nickeltransport direkt nachgewiesen (Eitinger *et al.*, 2000). Die Komplementation der Nickelaufnahme defiziten *nic1-1*-Hefemutante (*S. pombe*) durch Nic1p konnte unter Verwendung von radioaktiv markiertem Nickel ($^{63}\text{Ni}^{2+}$) direkt gemessen werden. Die Wachstums-komplementation der *nic1-1*-Hefemutante mit At-NiCo1, At-NiCo2 sowie Ps-NiCo könnte somit über eine mögliche Nickel-Transportfunktion Aufschluss geben.

Sollte dieser zukünftige Test auch negativ ausfallen, liegt die Vermutung nahe, dass die Proteine PIC1 sowie Proteine der NiCoT-Familie aus pflanzlichen Organismen den Transport von Eisen bzw. Metallen als einzelne Untereinheit eines Translocons nur sehr bedingt, oder gar nicht bewerkstelligen können. Um zu überprüfen ob PIC1, NiCo und YGGT zusammen benötigt werden um Eisen bzw. Metalle zu transportieren, könnte man die Komplementation von Hefemutanten mit zwei oder allen drei Proteinen gleichzeitig versuchen. Die Transformation der Mutante mit zwei oder mehr Proteinen scheiterte bisher an dem Fehlen von zwei bzw. drei Transformationsvektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern. Auch eine stabile Vortransformation der Hefemutanten mit einem der Konstrukte ist denkbar. Somit bleibt es, ein System zu etablieren, in dem der Metalltransport eines Proteinkomplexes direkt nachgewiesen werden kann. Bei der heterologen Expression von At-NiCo1 in *E.coli* wurde das Eisenaufnahme regulierende Protein FurA induziert (Abbildung 10). Aufgrund dieses indirekten Hinweises würde es sich anbieten, Komplementationsstudien von, in der Metallaufnahme defiziten *E.coli*-Mutanten (Degen *et al.*, 1999), durchzuführen.

Einen weiteren Ansatz zur Funktionsanalyse lieferten Shingles und Mitarbeiter (2001). An Vesikeln der inneren, chloroplastidären Hüllmembran, gefüllt mit einem mit Eisen reagierenden Fluoreszenzfarbstoff, konnte ein aktiver, protonenabhängiger Eisentransport gemessen werden (Shingles *et al.*, 2001). Mit diesem Ansatz als Basis könnte versucht werden, den messbaren Eisentransport mit den drei, spezifisch gegen PIC1, NiCo sowie YGGT gerichteten, Antikörpern zu blockieren. Somit wäre eine direkte Beteiligung der Proteine am Eisentransport nachgewiesen. Sollte dies funktionieren, könnte unter Zugabe von verschiedenen Metallen auch die Substratspezifität des Transportkomplexes bestimmt werden. Momentan wird angenommen, dass ein chloroplastidäres Metalltranslocon nicht nur Eisen, sondern auch andere zweiwertige Metallionen transportieren kann. Gestützt wird diese Vermutung durch die Arbeiten von Shingles und Mitarbeitern. Sie haben eine Inhibierung des

Transports von Fe^{2+} -Ionen über die innere chloroplastidäre Hüllmembran durch Zn^{2+} , Cu^{2+} und Mn^{2+} festgestellt (Shingles *et al.*, 2001; Shingles *et al.*, 2002).

VI.3. Funktion in der Pflanze

Nicht nur in funktionellen Analysen in Mikroorganismen, sondern auch bei der Analyse von Verlust- sowie Überexpressionsmutanten in *Arabidopsis*, wurden eindeutige Hinweise auf eine Funktion im Eisentransport von PIC1 gezeigt. Neben einem stark chlorotischen Phänotyp der Pflanzen konnte ein Defekt in der Entwicklung der Chloroplasten sowie eine Beeinträchtigung der Metallhomöostase gezeigt werden (Duy *et al.*, 2007b; Duy *et al.*, 2011). Um Vergleichbare Nachweise für die Funktion der NiCoT-Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 zu erbringen, wurden Einzel- sowie eine Doppelverlustmutante in *Arabidopsis* untersucht.

VI.3.1. NiCo-Proteine

Um in *Arabidopsis* einen funktionellen Nachweis der Proteine At-NiCo1 und At-NiCo2 *in planta* zu erbringen, wurden induzierbare RNAi-"knock down" Einzelmutanten sowie eine At-NiCo2-RNAi-"knock down"-Mutante in dem *nico1-1*-"Knock out"-Hintergrund (*nico1/2-dm*) generiert. Die Einzelmutanten zeigten keine Auffälligkeiten in Wachstum und Entwicklung. In mehreren unabhängigen Linien der *nico1/2-dm* konnte hingegen ein letaler Phänotyp beobachtet werden, wenn die NiCo2-RNAi-Induktion direkt mit der Keimung stattfand. Eine Induktion von 10-14 Tage alten Keimlingen der *nico1/2-dm* führte zu einem Entwicklungsstopp und schließlich zu einer starken Ausprägung von Chlorosen in den Blättern, bis hin zum Absterben des gesamten Keimlings (Abbildung 22). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass beide NiCo-Proteine die gleiche Funktion ausführen und sich gegenseitig ersetzen können. Eine erhöhte Expression von *At-NiCo2* in den Blättern der *nico1-1*-Mutante untermauert diese Vermutung. Wurde der "knock down" von *At-NiCo2* in vier bis fünf Wochen alten *nico1/2-dm* induziert, konnten nekrotische Läsionen in den Blättern beobachtet werden (Abbildung 22D). Diese Beobachtungen decken sich mit den Beschreibungen des Phänotyps der OsNiCo-"knock down"-Mutante aus Reis, welcher als Zebra-Nekrose-Phänotyp beschrieben wurde (Li *et al.*, 2010). Der nekrotische Phänotyp soll in älteren Monokotyledonen (z.B. Reis) durch streifenartige und bei älteren Dikotyledonen (z.B. *Arabidopsis*) durch läsionsartige Chlorosen auftreten. Die weitere Entwicklung der im älteren Stadium induzierten Pflanzen schien bis hin zur Samenreife nicht beeinflusst zu sein. Somit scheint NiCo keine essentielle Funktion in der Blüten- bzw. Samenentwicklung zu haben. *Arabidopsis*-Pflanzen setzen allerdings das zur Induzierung verwendete Dexamethason

in ihrem Stoffwechsel um (persönliche Mitteilung von Iris Finkemeier, Department Biologie I, LMU München). Daher müsste bei zukünftiger Induktion älterer Pflanzen der "knock down" von *At-NiCo2* regelmäßig überprüft werden.

In einem Vergleich mit dem Phänotyp der "knock out"-Mutanten von PIC1 (Duy *et al.*, 2007b), zeigen beide Mutanten einen letalen Phänotyp kurz nach der Keimung. Genau wie bei der *pic1*-Mutante, ergrünen die Blätter der *nico1/2-dm* nach der Keimung unter induzierenden Bedingungen leicht, bevor der ganze Keimling nach ca. drei bis vier Wochen völlig chlorotisch wird (Abbildung 38A). Auch der Verlustmutante von At-YGGT-C hat einen embryoletalen Phänotyp während "knock down" Mutanten Chlorosen an jungen Blättern aufweisen (Kabeya *et al.*, 2010).

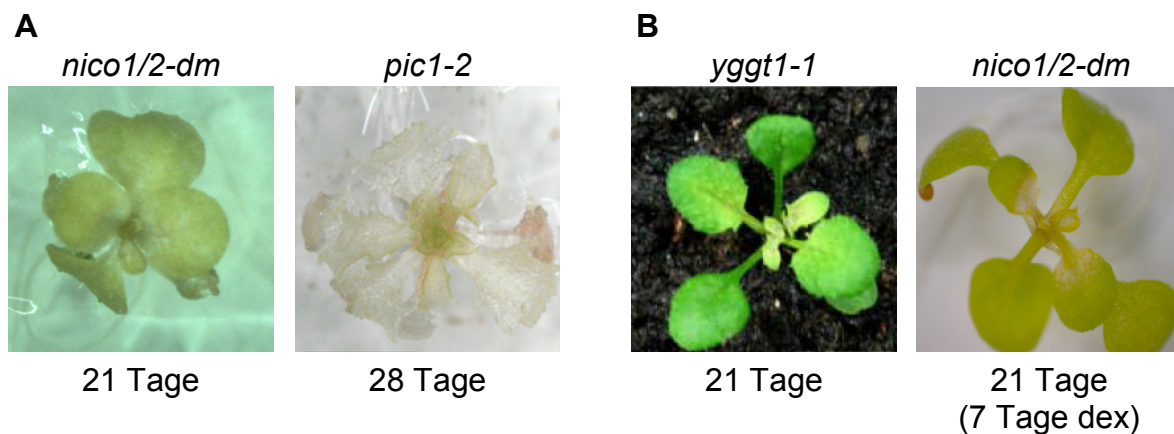


Abbildung 38: Phänotyp-Vergleich der *nico1/2-dm* mit *pic1-2* und *yggt1-1*

Vergleich der phänotypischen Ausprägungen der Chlorosen bei Mutanten der Proteine PIC1 (*pic1-2*), YGGT-C (*yggt1-1*) und der *nico1/2-dm*. **(A)** Die *nico1/2-dm*, 21 Tage unter induzierenden Bedingungen gewachsen, im Vergleich mit einer 28 Tage alten *pic1-2* "knock out"-Mutante (rechts, Duy *et al.*, 2007b). **(B)** Die 21 Tage alte *yggt1-1* "knock down"-Mutante (Kabeya *et al.*, 2010) im Vergleich mit der 21 Tage alten, sieben Tage induzierten *nico1/2-dm*. Die Abbildungen sind nicht maßstabsgetreu.

Aufgrund fehlender, induzierbarer Verlustmutanten von PIC1 und den At-YGGT-Proteinen, war ein Vergleich des Phänotyps, bzw. der Auswirkung eines Proteinverlusts im späteren Wachstumsstadium, bisher nur bedingt möglich. Kabeya *et al.* (2010) beobachtete einen chlorotischen Phänotyp in den jungen Blättern drei Wochen alter *yggt1-1*-Mutanten (*yggt1-1*). Dieser Phänotyp ist dem der drei Wochen alten und sieben Tage induzierten *nico1/2-dm* sehr ähnlich (Abbildung 38B). Daher stellt die Generierung von induzierbaren PIC1- und YGGT-"knock down"-Mutanten eine wichtige Aufgabe für die Zukunft dar. Verlustmutanten von At-YGGT-A sowie die von At-YGGT-B zeigen keinen auffälligen Phänotyp (Lezhneva *et al.*, 2008). Die bisherigen Übereinstimmungen untermauern die zusammenhängende Funktion aller drei Proteine sowie die Zugehörigkeit zu

ein und demselben Proteinkomplex. Auch die gezeigte Regulation der Expression von PIC1 in der *nic1/2-dm* stellt ein weiteres Indiz dar. Zukünftige Untersuchungen der *nic1/2-dm* auf ultrastruktureller Ebene könnte zudem weiteren Aufschluss über die Funktion der NiCo-Proteine bringen und einen näheren Vergleich mit den heterozygoten PIC1-Mutanten zulassen. Die nähere Untersuchung induzierbarer At-YGGT-C-Mutanten könnte interessante Erkenntnisse über deren Funktion, sowie über die Zugehörigkeit zu dem PIC1-NiCo-YGGT-Metaltranslocon bringen. Bei der Anzucht der *yggc-c*-„knock down“-Mutante konnte bereits unter erhöhter Eisenzugabe ein Rückgang von Blattnekrosen beobachtet werden (C. Vasquez-Robinet, K. Philippar unveröffentlicht). Auch dies impliziert einen Zusammenhang zur Eisenhomöostase von YGGT-C und bietet einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Versuche.

In einer ersten Analyse induzierbarer Überexpressionlinien von At-NiCo1 sowie At-NiCo2, konnte unter Standardbedingungen kein sichtbarer Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden. Dies ist, wenn man einen Vergleich zu den PIC-Überexpressionspflanzen zieht (Duy *et al.*, 2011), ein überraschendes Ergebnis. Allerdings könnte dieses Ergebnis die Vermutung einer rein sensorischen und regulierenden Funktion der pflanzlichen NiCo-Proteine unterstützen, bei der eine erhöhte Konzentration der Proteine keinen Einfluss auf die Metallhomöostase hat. In zukünftigen Versuchen sollte das Wachstum der NiCo-Überexprimierer-Pflanzen unter Eisenmangel- bzw. Eisenstress untersucht werden. Dadurch könnte eine erhöhte Eisen-Sensitivität festgestellt werden und somit ein Rückschluss auf die mögliche Funktion als metallbindendes Sensorprotein (ähnlich dem Protein CbiM, vergleiche Abbildung 37) gezogen werden.

Die Ursache für die Bildung von nekrotischen Läsionen deutet oftmals auf oxidativen Stress und somit auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hin. Ursache dafür kann wiederum eine Beeinflussung der Metallhomöostase in der Zelle sein. Erste Untersuchungen, ob die Bildung von ROS ein mögliche Ursache des chlorotischen Phänotyps darstellt, wurden an 14 Tage alten, induzierten Keimlingen der *nic1/2-dm* unter verschiedenen Lichtbedingungen durchgeführt (Abbildung 24). Eine wesentliche Verstärkung des chlorotischen Phänotyps unter Dauerlicht sowie ein nahezu den Wildtyp-Pflanzen ähnliches Wachstumsverhalten unter Niedriglicht-Bedingungen unterstützten die Vermutung. Eine direkte Messung von ROS in Blättern der Doppelmutante könnte weiteren Aufschluss geben. Li *et al.* (2010) erhielten ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung der NiCo-Mutante aus Reis. Allerdings führten sie die Ursache auf eine defekte Chloroplastenbiogenese zurück und schlussfolgerten auch aufgrund der wahrscheinlich falschen Thylakoidlokalisation von NiCo,

dass das NiCo-Protein aus Reis für den Schutz der Chloroplasten vor Licht, speziell in der Entwicklungsphase der Photosysteme, benötigt wird (Li *et al.*, 2010). In dem Zusammenhang vermuteten Li und Mitarbeiter eine defekte Synthese des Proteins D1, welches eine Funktion in der Reparatur des Photosystems II erfüllt. Eine Defekte Synthese von D1, welches einen für die Funktion essentiellen Mn_4Ca -Komplex besitzt, kann allerdings auch auf einen Defekt in der Metallhomöostase zurück zu führen sein. Die Bildung von ROS lässt sich ebenso durch einen Defekt in der Metallhomöostase erklären. Als Beispiel kann ein gestörter Eisentransport in den Chloroplasten eine Delokalisation von Eisen in der Zelle zur Folge haben. Eine Akkumulation von freiem Eisen im Cytosol der *nico1/2-dm* ist daher denkbar und wurde führt somit über die Fenton-Reaktion zur Bildung von ROS führen. Ein Zusammenhang zwischen defekter Eisenhomöostase und ROS-Produktion wurde nicht nur in Pflanzen (Kampfenkel *et al.*, 1995; Prasad, 1999, Pekker *et al.*, 2002) sondern auch in Bakterien, Hefen und Tieren gezeigt (siehe Zitate in Ravet *et al.*, 2009). Bei der Anzucht der *nico1/2-dm* unter Dauerlicht und Eisenmangelbedingungen konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass eine weniger starke Ausprägung des chlorotischen Phänotyps stattfindet (nicht gezeigt). Kann diese Beobachtung bestätigt werden, wäre dies ein weiteres Indiz für die Funktion von NiCo im Eisentransport. In weiteren Experimenten könnte versucht werden, durch stringendere Eisenmangelbedingung, z.B. Erhöhung der Konzentration des Eisenchelators Ferrozin oder des pH-Wertes des Pflanzenanzuchtmediums, die Reduzierung der Chlorose unter Dauerlicht deutlicher zu machen. Zudem könnte durch energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) eine Delokalisation von Eisen und von anderen Metallen in der Zelle direkt gezeigt werden. Eine Bestätigung der Eisendelokalisation würde bekräftigen, dass der Verlust des Proteins NiCo einen direkten Einfluss auf die Eisenhomöostase hat.

In der durchgeführten Transkriptom-Analyse der *nico1/2-dm* konnten zudem auch Hinweise auf Stress-Symptome gefunden werden. Allen voran die Induktion von 60 Genen der funktionelle Gruppe "biotischer Stress". Auch die am stärksten induzierten Gene waren dieser Gruppe zugeteilt (Tabelle 9). Ein indirekter Zusammenhang könnte hier sein, dass die Bildung von ROS durch eine defekte Metallhomöostase zu einer induzierten Expression typischer Gene für biotischen sowie abiotischen Stress führt. Auch dies wurde bereits in einigen Arbeiten festgestellt und von Mithofer *et al.* (2004) zusammengefasst. Auch ein Zusammenhang zur Regulation von Genen für die Zellwandstabilisierung wurde hergestellt. Dies würde auch die in meinen Analysen festgestellte Expression und Repression von Genen der funktionellen Gruppe "Zellwand" erklären. Weitere Indizien für Eisen- bzw. Metallstress in *nico1/2-dm* sind Regulationen von Genen in den Gruppen "Redox" sowie "Oxidasen" und

"Peroxidasen". Auch die Regulation von Genen aus der Gruppe "Cytochrome" stellt einen guten Hinweis dar. Cytochrome sind Häm-Proteine mit Eisen als Zentralatom.

Einige Proteine mit bekannter Funktion, deren Regulation für eine Störung der Metallhomöostase innerhalb der Zelle sprechen, wurden sieben Tage nach der Induktion in der *nico1/2-dm* gegenüber Wildtyppflanzen induziert vorgefunden (Tabelle 10). Zu nennen wäre das induzierte Protein ZIP11. Dieses gehört zu der Gruppe der Zn^{2+} - Fe^{2+} -Permeasen (Familie 2.A.5 der "Transporter Classification Database" [TCDB]; Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009) und somit zur gleichen Überfamilie wie die NiCoT-Proteine (2.A.52). Ebenso zu erwähnen ist das in der Plasmamembran lokalisierte Protein YSL3. YSL3 wird bei Eisenüberschuss in der Pflanze in seiner Expression hochreguliert (Waters *et al.*, 2006). Das Protein AtPCS1 wird durch Kupferstress induziert und ist ein für die Phytochelatin-Synthese wichtiges Protein (Vatamaniuk *et al.*, 1999). Dem Protein TAT3 wird eine indirekte Regulierung durch Kupferstress aufgezeigt (Yamasaki *et al.*, 2009). Die letzten zwei Proteine, der in Tabelle 10 aufgeführten Gene AtCHX17 sowie AtCOBL5, geben keinen direkten Hinweis auf Metallhomöostase. AtCHX17 wird als ein in Wurzeln lokalisierter K^+ / H^+ -Antiporter (Cellier *et al.*, 2004) beschrieben und AtCOBL5 ist ein Protein der COBRA-Familie mit bisher unbekannter Funktion.

Aufgrund der möglichen Funktion von NiCo im Eisentransport oder als Metallsensor-Protein lag die Vermutung nahe, dass ein Verlust von NiCo auch die Aufnahme von Eisen bzw. anderen Metallen und folglich deren Gehalt in der Pflanze beeinflusst. Bei der Bestimmung der Konzentrationen von Co, Cu, Zn, Ni, und Mn in der *nico1/2-dm* vor, sowie zehn Tage nach der Induktion des NiCo2-"knock-down", konnte allerdings kein Unterschied zum Wildtyp gemessen werden (Abbildung 23). Der Anstieg der Eisenkonzentration nach zehn Tagen in der Wildtyplinie Col-0 gegenüber den Mutantenlinien konnte in der zweiten Wildtyp-Linie Luciferase nicht bestätigt werden. Somit wird im Moment davon ausgegangen, dass die Metallkonzentration im gesamten Spross der Pflanze durch einen Verlust von NiCo nicht beeinflusst wird. Wie bereits diskutiert, würde die Untersuchung der Metallverteilung in der Zelle durch z.B. energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) weiteren Aufschluss bringen.

VI.4. Molekulare Interaktionen - CBY, NAP13 und NAP14

Die Untersuchung der Mitglieder der CBY-Proteinfamilie führt auf die Dissertation von Daniela Duy (2009) zurück. Sie spekulierte über eine mögliche Interaktion der löslichen ABC-Untereinheiten NAP13 und NAP14 (Shimoni-Shor *et al.*, 2010) mit PIC1. In Interaktionsstudien in dem BifC- sowie in den Split-Ubiquitin-System konnte allerdings keine Interaktion gezeigt werden. Auch in der Immunfällung gegen PIC1 konnten NAP13 und NAP14 nicht identifiziert werden. Somit wird eine Funktion von NAP13 bzw. NAP14 als die bisher unbekannte NBD-Domäne in dem PIC1-NiCo-YGGT-Metalltranslocon (vgl. Abbildung 37) ausgeschlossen. GFP-Fusionsproteine von NAP13 und NAP14 wurden im Stroma des Chloroplasten nachgewiesen werden (Duy, 2009). Im Gegensatz dazu wurden beide Proteine in der vorliegenden Arbeit durch Immunoblotanalysen mit spezifisch gegen NAP13 und NAP14 gerichteten Antikörpern in der Fraktion von inneren Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten detektiert (Abbildung 32A). Dies weist, ebenso wie der durchgeführte Membranassoziationstest (Abbildung 33) auf eine Interaktion mit einem in der Membran verankerten Protein hin. In einer Immunfällung gegen NAP13 konnte das, als transmembran vorhergesagte, Permease-Protein CBY gefällt werden (Diplomarbeit Lena Voithenberg, 2011). In einer Immunfällung gegen NAP14 blieb dieser Interaktionsnachweis allerdings aus. Aus diesem Ergebnis und aus dem Grund das NAP14 höchstwahrscheinlich mit Plastoglobuli assoziiert ist (Youngsook Lee, POSTECH Pohang, Korea; unveröffentlichte Daten), fokussierte sich die weitere Arbeit auf den Interaktionsnachweis von CBY und NAP13. Interessanterweise ist das Protein CBY als CbiQ-Permease-Untereinheit (InterPro Datenbank: IPR003339; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) und sll1623, das orthologe Protein zu NAP13 aus *Synechocystis*, als CbiO-ATP-Bindeprotein eines Kobalt-ABC-Transporters (CyanoBase; <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>) annotiert. Somit könnten NAP13 und CBY die zwei Untereinheiten eines klassischen ABC-Transporters, bestehend aus zwei TMDs und zwei NBDs, darstellen (Abbildung 39).

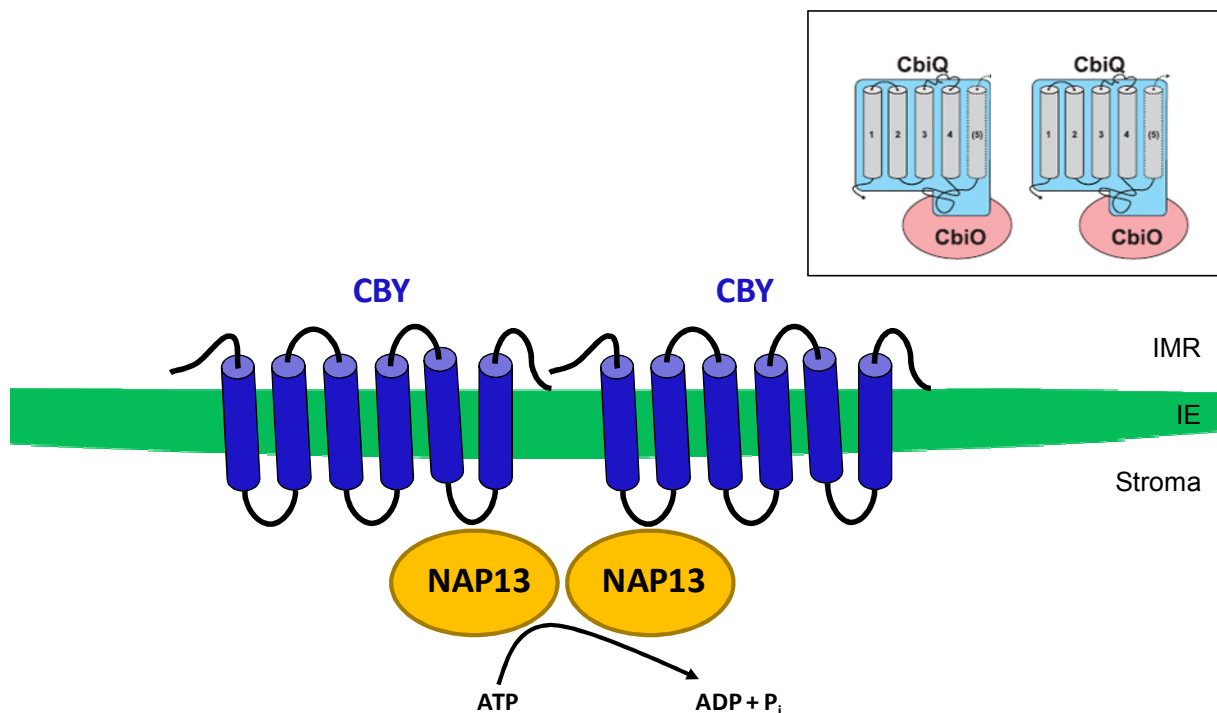


Abbildung 39: Hypothetisches Modell des Metalltranslocons CBY-NAP13

Topologie eines hypothetischen Modells des Metalltranslocons aus CBY und NAP13. Vorhergesagte transmembrane α -Helices sind als Zylinder dargestellt. Zum Vergleich ist die transmembrane Domäne CbiQ sowie die lösliche Domäne CbiO des CbiMNQO aus Rodioniv *et al.* (2006) als klassisches ABC-Transportersystem dargestellt. IMR: Intermembranraum, IE: innere Chloroplasten-Hüllmembran.

Die dazu vorausgesetzte Lokalisation von CBY in der inneren chloroplastidären Hüllmembran konnte bisher aufgrund fehlender Spezifität des Peptidantikörpers noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine GFP-Fusion zeigte allerdings eine generelle Hüllmembran-Lokalisation von CBY an (Abbildung 34A). Ein weiterer Nachweis der Interaktion von CBY und NAP13, z.B. in den BifC- sowie Split-Ubiquitin-Systemen, konnte nicht erbracht werden. Allerdings ist es möglich, dass aufgrund der ungeklärten Membranorientierung von CBY, die komplementäre, an CBY fusionierte GFP- bzw. Ubiquitin-Hälfte, nicht zum Stroma des Chloroplasten bzw. Cytosol der Hefezellen hin orientiert ist. Somit würde keine Interaktion mit dem im Stroma/Cytosol lokalisierten Protein NAP13 stattfinden können. Durch gleichzeitige Expression des CFP-fusioniertem CBY-Proteins und dem YFP-fusionierten NAP13-Protein konnte allerdings eine mögliche Interaktion nachgewiesen werden, da das NAP13-YFP-Signal rund um den Chloroplasten detektiert werden konnte (Abbildung 34). Dieser Signal-"Shift" muss von der Interaktion mit dem in der Hüllmembran lokalisierten und überexprimierten Protein CBY stammen. Weil eine gleichzeitige Detektion des CBY-CFP-Signals, aus bisher nicht bekannten Gründen,

nicht möglich war, wird zukünftig versucht, ein überlappendes NAP13-GFP- und CBY-RFP-Signal als Interaktionsnachweis darzustellen.

Mit den Proteinen CBY und NAP13 wurden zwei Untereinheiten eines weiteren chloroplastidären Metalltranstransportes untersucht. In vorherigen Arbeiten konnte durch Analyse von NAP13-"knock out"-Mutanten, welche einen ähnlich drastischen Phänotyp wie die PIC1-"knock out"-Mutanten zeigen, ein Zusammenhang zur Metallhomöostase hergestellt werden. In zukünftigen Arbeiten muss es daher das Ziel sein, die Funktion der Proteine sowie des gesamten Transporters zu bestimmen. Hierzu könnten ATP-Hydrolyse-Tests mit NAP13 sowie Komplementationsversuche von Hefe- oder Bakterien-Mutanten mit CBY durchgeführt werden. Auch die weitere Analyse von *Arabidopsis*-Mutanten, speziell induzierbarer CBY-"knock down"-Linien ist notwendig um weitere Erkenntnisse über beide Proteine zu bekommen. Desweiteren gilt es, das vorhergesagte Modell (Abbildung 39) zu bestätigen oder weitere mögliche Untereinheiten zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurden pflanzliche Proteine der NiCoT-Familie neu beschrieben und eine mögliche Zugehörigkeit derer zu einem chloroplastidären Metalltranslocon aufgezeigt. In dem Zusammenhang wurde eine ganz neue Hypothese über die Zusammensetzung des Translocons aufgestellt. Des weiteren wurde die Interaktion der Proteine NAP13 und CBY beschrieben und somit die Möglichkeit eines zweiten Metalltranslocons in der inneren chloroplastidären Hüllmembran diskutiert.

VII. LITERATUR

- Abdel-Ghany, S. E., P. Muller-Moule, K. K. Niyogi, M. Pilon and T. Shikanai (2005).**"Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts." *Plant Cell* **17**(4): 1233-1251.
- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk and C. Heller (2003).**"Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* ", *Science* **301**(5633): 653-657.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997).**"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nuc.Acids Res.* **25**(17): 3389-3402.
- Arrivault, S., T. Senger and U. Kramer (2006).**"The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply." *Plant J* **46**(5): 861-879.
- Ashraf, M. Y., R. Sadiq, M. Hussain, M. Ashraf and M. S. Ahmad (2011).**"Toxic effect of nickel (Ni) on growth and metabolism in germinating seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.)." *Biol Trace Elem Res* **143**(3): 1695-1703.
- Bailey, S., E. Thompson, P. J. Nixon, P. Horton, C. W. Mullineaux, C. Robinson and N. H. Mann (2002).**"A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle in vivo." *J Biol Chem* **277**(3): 2006-2011.
- Baker, A. J. M., S. P. McGrath, R. D. Reeves and J. A. C. Smith (2000).**"Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils." *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*: 85-107.
- Bashir, K., Y. Ishimaru and N. K. Nishizawa (2011a).**"Identification and characterization of the major mitochondrial Fe transporter in rice." *Plant Signal Behav* **6**(10): 1591-1593.
- Bashir, K., Y. Ishimaru, H. Shimo, S. Nagasaka, M. Fujimoto, H. Takanashi, N. Tsutsumi, G. An, H. Nakanishi and N. K. Nishizawa (2011b).**"The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth." *Nat Commun* **2**: 322.
- Baxter, I., B. Muthukumar, H. C. Park, P. Buchner, B. Lahner, J. Danku, K. Zhao, J. Lee, M. J. Hawkesford, M. L. Guerinot and D. E. Salt (2008).**"Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1)." *PLoS Genet* **4**(2): e1000004.
- Bechthold, N., J. Ellis and G. Pelletier (1993).**"In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants ", *C.R.Acad.Sci.Paris/Life sciences* **316**: 1194-1199.

- Bell, P. E., C. D. Nau, J. T. Brown, J. Konisky and R. J. Kadner (1990).**"Genetic suppression demonstrates interaction of TonB protein with outer membrane transport proteins in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **172**(7): 3826-3829.
- Blaby-Haas, C. E. and S. S. Merchant (2012).**"The ins and outs of algal metal transport." *Biochim Biophys Acta* **1823**(9): 1531-1552.
- Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm and J. Deisenhofer (1999).**"Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*." *Nat Struct Biol* **6**(1): 56-63.
- Cellier, F., G. Conejero, L. Ricaud, D. T. Luu, M. Lepetit, F. Gosti and F. Casse (2004).**"Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis." *Plant J* **39**(6): 834-846.
- Conte, S. S. and E. L. Walker (2011).**"Transporters contributing to iron trafficking in plants." *Mol Plant* **4**(3): 464-476.
- Curie, C., Z. Panaviene, C. Loulergue, S. L. Dellaporta, J. F. Briat and E. L. Walker (2001).**"Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake." *Nature* **409**(6818): 346-349.
- Degen, O. and T. Eitinger (2002).**"Substrate specificity of nickel/cobalt permeases: insights from mutants altered in transmembrane domains I and II." *J Bacteriol* **184**(13): 3569-3577.
- Degen, O., M. Kobayashi, S. Shimizu and T. Eitinger (1999).**"Selective transport of divalent cations by transition metal permeases: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN and the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF." *Arch Microbiol* **171**(3): 139-145.
- Desbrosses-Fonrouge, A. G., K. Voigt, A. Schroder, S. Arrivault, S. Thomine and U. Kramer (2005).**"*Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation." *FEBS Lett* **579**(19): 4165-4174.
- Dinneny, J. R., T. A. Long, J. Y. Wang, J. W. Jung, D. Mace, S. Pointer, C. Barron, S. M. Brady, J. Schiefelbein and P. N. Benfey (2008).**"Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress." *Science* **320**(5878): 942-945.
- Dubey, D. and A. Pandey (2011).**"EFFECT OF NICKEL (Ni) ON CHLOROPHYLL, LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITIES IN BLACK GRAM (*VIGNA MUNGO*) LEAVES." *International Jurnal of Science and Nature* **2** (2): 6.
- Duy, D. (2009).**"PIC1, eine Eisen-Permease in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten." *Ludwig Maximilian Universität; Ludwig Maximilian Universität; Fakultät für Biologie*: 118.
- Duy, D., J. Soll and K. Philippar (2007a).**"Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts." *Biol Chem.* **388**(9): 879-889.

- Duy, D., R. Stübe, G. Wanner and K. Philippar (2011).**"The Chloroplast Permease PIC1 Regulates Plant Growth and Development by Directing Homeostasis and Transport of Iron." *Plant Physiology* **155**(4): 1709-1722.
- Duy, D., G. Wanner, A. R. Meda, N. von Wiren, J. Soll and K. Philippar (2007b).**"PIC1, an ancient permease in Arabidopsis chloroplasts, mediates iron transport." *Plant Cell* **19**(3): 986-1006.
- Eide, D., M. Broderius, J. Fett and M. L. Guerinot (1996).**"A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5624-5628.
- Eitinger, T., O. Degen, U. Bohnke and M. Muller (2000).**"Nic1p, a relative of bacterial transition metal permeases in *Schizosaccharomyces pombe*, provides nickel ion for urease biosynthesis." *J Biol Chem* **275**(42): 33184.
- Eitinger, T., J. Suhr, L. Moore and J. A. Smith (2005).**"Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations." *BioMetals* **18**(4): 399-405.
- Eitinger, T., L. Wolfram, O. Degen and C. Anthon (1997).**"A Ni²⁺ binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease." *J Biol Chem* **272**(27): 17139-17144.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen and G. von Heijne (1999).**"ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites." *Protein Sci.* **8**(5): 978-984.
- Franssen, S. U., R. P. Shrestha, A. Brautigam, E. Bornberg-Bauer and A. P. Weber (2011).**"Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing." *BMC Genomics* **12**: 227.
- Froehlich, J. E., C. G. Wilkerson, W. K. Ray, R. S. McAndrew, K. W. Osteryoung, D. A. Gage and B. S. Phinney (2003).**"Proteomic study of the Arabidopsis thaliana chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis." *J Proteome Res* **2**(4): 413-425.
- Fulkerson, J. F., Jr. and H. L. Mobley (2000).**"Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III." *J Bacteriol* **182**(6): 1722-1730.
- Garcia, O., P. Bouige, C. Forestier and E. Dassa (2004).**"Inventory and Comparative Analysis of Rice and Arabidopsis ATP-binding Cassette (ABC) Systems." *J.Mol.Biol.* **343**(1): 249-265.
- Gasber, A., S. Klaumann, O. Trentmann, A. Trampczynska, S. Clemens, S. Schneider, N. Sauer, I. Feifer, F. Bittner, R. R. Mendel and H. E. Neuhaus (2011).**"Identification of an Arabidopsis solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate." *Plant Biol (Stuttg)* **13**(5): 710-718.

- Gehl, C., R. Waadt, J. Kudla, R. R. Mendel and R. Hansch (2009).** "New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation." *Mol Plant* **2**(5): 1051-1058.
- Gietz, R. D. and R. H. Schiestl (1991).** "Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier." *Yeast* **7**(3): 253-263.
- Gonzalez, A., M. T. Bes, M. L. Peleato and M. F. Fillat (2011).** "Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis." *J Proteomics* **74**(5): 660-671.
- Gudmundsdottir, A., P. E. Bell, M. D. Lundrigan, C. Bradbeer and R. J. Kadner (1989).** "Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport." *J Bacteriol* **171**(12): 6526-6533.
- Hall, J. L. and L. E. Williams (2003).** "Transition metal transporters in plants." *J.Ex.Bot.* **54**(393): 2601-2613.
- Hanahan, D. (1983).** "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hänsch, R. and R. R. Mendel (2009).** "Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)." *Curr Opin Plant Biol* **12**(3): 259-266.
- Herald, V. L., J. L. Heazlewood, D. A. Day and A. H. Millar (2003).** "Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria." *FEBS Lett* **537**(1-3): 96-100.
- Hirschi, K. D., V. D. Korenkov, N. L. Wilganowski and G. J. Wagner (2000).** "Expression of arabidopsis CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance." *Plant Physiol* **124**(1): 125-133.
- Holyoak, T., S. M. Sullivan and T. Nowak (2006).** "Structural insights into the mechanism of PEPCCK catalysis." *Biochemistry* **45**(27): 8254-8263.
- Hussain, D., M. J. Haydon, Y. Wang, E. Wong, S. M. Sherson, J. Young, J. Camakaris, J. F. Harper and C. S. Cobbett (2004).** "P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **16**(5): 1327-1339.
- Inoue, H., T. Kobayashi, T. Nozoye, M. Takahashi, Y. Kakei, K. Suzuki, M. Nakazono, H. Nakanishi, S. Mori and N. K. Nishizawa (2009).** "Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings." *J Biol Chem* **284**(6): 3470-3479.
- Iwig, J. S., J. L. Rowe and P. T. Chivers (2006).** "Nickel homeostasis in *Escherichia coli* - the *rcnR-rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function." *Mol Microbiol* **62**(1): 252-262.

- Jeong, J., C. Cohu, L. Kerkeb, M. Pilon, E. L. Connolly and M. L. Guerinot (2008).** "Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**(30): 10619-10624.
- Kabeya, Y., H. Nakanishi, K. Suzuki, T. Ichikawa, Y. Kondou, M. Matsui and S. Y. Miyagishima (2010).** "The YlmG protein has a conserved function related to the distribution of nucleoids in chloroplasts and cyanobacteria." *BMC Plant Biol* **10**: 57.
- Kampfenkel, K., M. Van Montagu and D. Inze (1995).** "Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia* Plants (Implications to Oxidative Stress)." *Plant Physiol* **107**(3): 725-735.
- Keegstra, K. and A. E. Youssif (1986).** "Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes.", *Methods Enzymol.* **118**: 316-325.
- Khan, A. S., E. Van Driessche, L. Kanarek and S. Beeckmans (1992).** "The purification and physicochemical characterization of maize (*Zea mays* L.) isocitrate lyase." *Arch Biochem Biophys* **297**(1): 9-18.
- Kim, S. A. and M. L. Guerinot (2007).** "Mining iron: Iron uptake and transport in plants." *FEBS Letters* **581**(12): 2273-2280.
- Kim, S. A., T. Punshon, A. Lanzirotti, L. Li, J. M. Alonso, J. R. Ecker, J. Kaplan and M. L. Guerinot (2006).** "Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1." *Science* **314**(5803): 1295-1298.
- Kobae, Y., T. Uemura, M. H. Sato, M. Ohnishi, T. Mimura, T. Nakagawa and M. Maeshima (2004).** "Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis." *Plant Cell Physiol* **45**(12): 1749-1758.
- Kobayashi, T. and N. K. Nishizawa (2012).** "Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants." *Annu Rev Plant Biol* **63**: 131-152.
- Koncz, C. and J. Schell (1986).** "The Promoter of Tl-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector." *Molecular & General Genetics* **204**(3): 383-396.
- Krämer, U. and S. Clemens (2005).** "Function and homeostasis of zinc, copper and nickel in plants.", *Topics Curr Genet* **14**: 56.
- Krämer, U., R. D. Smith, W. W. Wenzel, I. Raskin and D. E. Salt (1997).** "The Role of Metal Transport and Tolerance in Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy." *Plant Physiol* **115**(4): 1641-1650.
- Kunst, L. (1998).** "Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*." *Methods Mol Biol* **82**: 43-48.
- Lan, H. X., Z. F. Wang, Q. H. Wang, M. M. Wang, Y. M. Bao, J. Huang and H. S. Zhang (2012).** "Characterization of a vacuolar zinc transporter OZT1 in rice (*Oryza sativa* L.)." *Mol Biol Rep*.

- Lanquar, V., F. Lelievre, S. Bolte, C. Hames, C. Alcon, D. Neumann, G. Vansuyt, C. Curie, A. Schroder and a. Kramer et (2005).**"Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron." *EMBO J.* **24**(23): 4041-4051.
- Lanquar, V., M. S. Ramos, F. Lelievre, H. Barbier-Brygoo, A. Krieger-Liszkay, U. Kramer and S. Thomine (2010).**"Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency." *Plant Physiol* **152**(4): 1986-1999.
- Larsen, R. A., D. Foster-Hartnett, M. A. McIntosh and K. Postle (1997).**"Regions of Escherichia coli TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions." *J Bacteriol* **179**(10): 3213-3221.
- Lezhneva, L., R. Kuras, G. Ephritikhine and C. de Vitry (2008).**"A novel pathway of cytochrome c biogenesis is involved in the assembly of the cytochrome b6f complex in arabidopsis chloroplasts." *J Biol Chem* **283**(36): 24608-24616.
- Li, H. M., T. Moore and K. Keegstra (1991).**"Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplasts." *Plant Cell* **3**(7): 709-717.
- Li, J., D. Pandeya, K. Nath, I. S. Zulfugarov, S. C. Yoo, H. Zhang, J. H. Yoo, S. H. Cho, H. J. Koh, D. S. Kim, H. S. Seo, B. C. Kang, C. H. Lee and N. C. Paek (2010).**"ZEBRA-NECROSIS, a thylakoid-bound protein, is critical for the photoprotection of developing chloroplasts during early leaf development." *Plant J* **62**(4): 713-725.
- Lohse, M., A. Nunes-Nesi, P. Kruger, A. Nagel, J. Hannemann, F. M. Giorgi, L. Childs, S. Osorio, D. Walther, J. Selbig, N. Sreenivasulu, M. Stitt, A. R. Fernie and B. Usadel (2010a).**"Robin: An Intuitive Wizard Application for R-Based Expression Microarray Quality Assessment and Analysis." *Plant Phys.* **153**(2): 642-651.
- Lohse, M., A. Nunes-Nesi, P. Kruger, A. Nagel, J. Hannemann, F. M. Giorgi, L. Childs, S. Osorio, D. Walther, J. Selbig, N. Sreenivasulu, M. Stitt, A. R. Fernie and B. Usadel (2010b).**"Robin: an intuitive wizard application for R-based expression microarray quality assessment and analysis." *Plant Physiol* **153**(2): 642-651.
- Lopez-Gomollon, S., J. A. Hernandez, S. Pellicer, V. E. Angarica, M. L. Peleato and M. F. Fillat (2007).**"Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in FurA and NtcA regulons." *J Mol Biol* **374**(1): 267-281.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982).** Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marschner, H. (1995).** Mineral nutrition of higher plants. London, U.K., Academic Press Limited.
- Masse, E., H. Salvail, G. Desnoyers and M. Arguin (2007).**"Small RNAs controlling iron metabolism." *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 140-145.

- Maxfield, A. B., D. N. Heaton and D. R. Winge (2004).**"Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane." *J Biol Chem* **279**(7): 5072-5080.
- Mendel, R. R. (2011).**"Cell biology of molybdenum in plants." *Plant Cell Rep* **30**(10): 1787-1797.
- Mendel, R. R. and T. Kruse (2012).**"Cell biology of molybdenum in plants and humans." *Biochim Biophys Acta* **1823**(9): 1568-1579.
- Merchant, S. and M. R. Sawaya (2005).**"The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery." *Plant Cell* **17**(3): 648-663.
- Merchant, S. S., M. D. Allen, J. Kropat, J. L. Moseley, J. C. Long, S. Tottey and A. M. Terauchi (2006).**"Between a rock and a hard place: Trace element nutrition in *Chlamydomonas*." *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1763**(7): 578-594.
- Mithofer, A., B. Schulze and W. Boland (2004).**"Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals." *FEBS Lett* **566**(1-3): 1-5.
- Moreno, I., L. Norambuena, D. Maturana, M. Toro, C. Vergara, A. Orellana, A. Zurita-Silva and V. R. Ordenes (2008).**"AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca²⁺/heavy metal pump." *J Biol Chem* **283**(15): 9633-9641.
- Morrissey, J. and M. L. Guerinot (2009).**"Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome." *Chem Rev* **109**(10): 4553-4567.
- Murata, Y., J. F. Ma, N. Yamaji, D. Ueno, K. Nomoto and T. Iwashita (2006).**"A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots." *Plant J* **46**(4): 563-572.
- Myouga, F., C. Hosoda, T. Umezawa, H. Iizumi, T. Kuromori, R. Motohashi, Y. Shono, N. Nagata, M. Ikeuchi and K. Shinozaki (2008).**"A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in Arabidopsis." *Plant Cell* **20**(11): 3148-3162.
- Navarro, C., L. F. Wu and M. A. Mandrand-Berthelot (1993).**"The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel." *Mol Microbiol* **9**(6): 1181-1191.
- Nouet, C., P. Motte and M. Hanikenne (2011).**"Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis." *Trends Plant Sci* **16**(7): 395-404.
- Nozoye, T., S. Nagasaka, T. Kobayashi, M. Takahashi, Y. Sato, N. Uozumi, H. Nakanishi and N. K. Nishizawa (2011).**"Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants." *J Biol Chem* **286**(7): 5446-5454.
- Ogierman, M. and V. Braun (2003).**"Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box." *J Bacteriol* **185**(6): 1870-1885.
- Palit, S., A. Sharma and G. Talukder (1994).**"Effects of Cobalt on Plants." *Botanical Review* **60**(2): 149-181.

- Palmer, C. M. and M. L. Guerinot (2009).**"Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants." *Nature Chem.Biol.* **5**(5): 333-340.
- Palmgren, M. G. (2001).**"PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 817-845.
- Pekker, I., E. Tel-Or and R. Mittler (2002).**"Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean." *Plant Mol Biol* **49**(5): 429-438.
- Pilon-Smits, E. A., C. F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli and M. Schiavon (2009).**"Physiological functions of beneficial elements." *Curr Opin Plant Biol* **12**(3): 267-274.
- Pilon, M., S. E. Abdel-Ghany, C. M. Cohu, K. A. Gogolin and H. Ye (2006).**"Copper cofactor delivery in plant cells." *Curr Opin Plant Biol* **9**(3): 256-263.
- Pilon, M., C. M. Cohu, K. Ravet, S. E. Abdel-Ghany and F. Gaymard (2009).**"Essential transition metal homeostasis in plants." *Curr Opin Plant Biol* **12**(3): 347-357.
- Pittman, J. K. (2005).**"Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis." *New Phytol* **167**(3): 733-742.
- Prasad, M., Ed. (1999).** Heavy Metal Stress in Plants - From Biomolecules to Ecosystems, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004.
- Puig, S., N. Andres-Colas, A. Garcia-Molina and L. Penarrubia (2007).**"Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications." *Plant Cell Environ* **30**(3): 271-290.
- Puig, S. and L. Penarrubia (2009).**"Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants." *Curr Opin Plant Biol* **12**(3): 299-306.
- Ravet, K., B. Touraine, J. Boucherez, J. F. Briat, F. Gaymard and F. Cellier (2009).**"Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis." *Plant J.* **57**(3): 400-412.
- Richter, S. and G. K. Lamppa (2003).**"Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal." *J Biol Chem* **278**(41): 39497-39502.
- Robinson, N. J., C. M. Procter, E. L. Connolly and M. L. Guerinot (1999).**"A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils." *Nature* **397**(6721): 694-697.
- Rodionov, D. A., P. Hebbeln, M. S. Gelfand and T. Eitinger (2006).**"Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters." *J Bacteriol* **188**(1): 317-327.

- Rodrigue, A., G. Effantin and M. A. Mandrand-Berthelot (2005).**"Identification of rcnA (yohM), a nickel and cobalt resistance gene in Escherichia coli." J Bacteriol **187**(8): 2912-2916.
- Rolland, N., M. Ferro, D. Seigneurin-Berny, J. Garin, R. Douce and J. Joyard (2003).**"Proteomics of chloroplast envelope membranes." Photosynthesis Res. **78**(3): 205-230.
- Römheld, V. and H. Marschner (1986).**"Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses." Plant Physiol **80**(1): 175-180.
- Roth, J. R., J. G. Lawrence, M. Rubenfield, S. Kieffer-Higgins and G. M. Church (1993).**"Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of Salmonella typhimurium." J Bacteriol **175**(11): 3303-3316.
- Saier, M. H., Jr., C. V. Tran and R. D. Barabote (2006).**"TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D181-186.
- Saier, M. H., Jr., M. R. Yen, K. Noto, D. G. Tamang and C. Elkan (2009).**"The Transporter Classification Database: recent advances." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D274-278.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988).**"Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Sancenon, V., S. Puig, I. Mateu-Andres, E. Dorcey, D. J. Thiele and L. Penarrubia (2004).**"The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development." J Biol Chem **279**(15): 15348-15355.
- Schmid, M., T. S. Davison, S. R. Henz, U. J. Pape, M. Demar, M. Vingron, B. Scholkopf, D. Weigel and J. U. Lohmann (2005).**"A gene expression map of Arabidopsis thaliana development." Nat Genet **37**(5): 501-506.
- Schoffler, H. and V. Braun (1989).**"Transport across the outer membrane of Escherichia coli K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane." Mol Gen Genet **217**(2-3): 378-383.
- Schwacke, R., A. Schneider, E. van der Graaff, K. Fischer, E. Catoni, M. Desimone, W. B. Frommer, U. I. Flugge and R. Kunze (2003).**"ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins." Plant Physiol. **131**(1): 16-26.
- Seigneurin-Berny, D., A. Gravot, P. Auroy, C. Mazard, A. Kraut, G. Finazzi, D. Grunwald, F. Rappaport, A. Vavasseur, J. Joyard, P. Richaud and N. Rolland (2006).**"HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions." Journal of Biological Chemistry **182** 2882-2892.
- Shikanai, T., P. Muller-Moule, Y. Munekage, K. K. Niyogi and M. Pilon (2003).**"PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts." Plant Cell **15**(6): 1333-1346.

- Shimoni-Shor, E., M. Hassidim, N. Yuval-Naeh and N. Keren (2010).**"Disruption of Nap14, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in *Arabidopsis thaliana* results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures." *Plant Cell Environ* **33**(6): 1029-1038.
- Shingles, R., M. North and R. E. McCarty (2001).**"Direct measurement of ferrous ion transport across membranes using a sensitive fluorometric assay." *Analytical Biochem.* **296**(1): 106-113.
- Shingles, R., M. North and R. E. McCarty (2002).**"Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes." *Plant Physiol.* **128**(3): 1022-1030.
- Shyu, Y. J., C. D. Suarez and C. D. Hu (2008).**"Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay." *Nat Protoc* **3**(11): 1693-1702.
- Sinclair, S. A. and U. Kramer (2012).**"The zinc homeostasis network of land plants." *Biochim Biophys Acta* **1823**(9): 1553-1567.
- Su, Z., M. F. Chai, P. L. Lu, R. An, J. Chen and X. C. Wang (2007).**"AtMTM1, a novel mitochondrial protein, may be involved in activation of the manganese-containing superoxide dismutase in *Arabidopsis*." *Planta* **226**(4): 1031-1039.
- Tan, Y. F., N. O'Toole, N. L. Taylor and A. H. Millar (2010).**"Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function." *Plant Physiol* **152**(2): 747-761.
- Tejada-Jimenez, M., A. Llamas, E. Sanz-Luque, A. Galvan and E. Fernandez (2007).**"A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 20126-20130.
- Thomine, S., F. Lelievre, E. Debarbieux, J. I. Schroeder and H. Barbier-Brygoo (2003).**"AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency." *Plant J.* **34**(5): 685-695.
- Turnlund, J. R. (2002).**"Molybdenum metabolism and requirements in humans." *Met Ions Biol Syst* **39**: 727-739.
- Umena, Y., K. Kawakami, J. R. Shen and N. Kamiya (2011).**"Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å." *Nature* **473**(7345): 55-60.
- Varotto, C., D. Maiwald, P. Pesaresi, P. Jahns, F. Salamini and D. Leister (2002).**"The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.* **31**(5): 589-599.
- Vatamaniuk, O. K., S. Mari, Y. P. Lu and P. A. Rea (1999).**"AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7110-7115.
- Vert, G., N. Grotz, F. Dedaldechamp, F. Gaymard, M. L. Guerinot, J. F. Briat and C. Curie (2002a).**"IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth." *Plant Cell* **14**(6): 1223-1233.

- Vert, G., N. Grotz, F. Dedaldechamp, F. Gaymard, M. L. Guerinot, J. F. Briat and C. Curie (2002b).**"IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth." *Plant Cell* **14**(6): 1223-1233.
- Voithenberg, L. F. V. v. (2011).**"CBY-NAP13-NAP14: A putative chloroplast-intrinsic ABC transporter complex for metals." Ludwig-Maximilians-Universität; Ludwig-Maximilians-Universität; Diploma: 72.
- Waegemann, K., S. Eichacker and J. Soll (1992).**"Outer Envelope Membranes from Chloroplasts Are Isolated as Right-Side-out Vesicles." *Planta* **187**(1): 89-94.
- Waters, B. M., H. H. Chu, R. J. Didonato, L. A. Roberts, R. B. Eisley, B. Lahner, D. E. Salt and E. L. Walker (2006).**"Mutations in Arabidopsis yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds." *Plant Physiol* **141**(4): 1446-1458.
- Whiteman, S. A., T. S. Nuhse, D. A. Ashford, D. Sanders and F. J. Maathuis (2008).**"A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane." *Plant J* **56**(1): 146-156.
- Wielopolska, A., H. Townley, I. Moore, P. Waterhouse and C. Helliwell (2005).**"A high-throughput inducible RNAi vector for plants." *Plant Biotechnol J* **3**(6): 583-590.
- Wolfram, L. and P. Bauerfeind (2002).**"Conserved low-affinity nickel-binding amino acids are essential for the function of the nickel permease NixA of *Helicobacter pylori*." *J Bacteriol* **184**(5): 1438-1443.
- Yamasaki, H., S. E. Abdel-Ghany, C. M. Cohu, Y. Kobayashi, T. Shikanai and M. Pilon (2007).**"Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis." *J Biol Chem* **282**(22): 16369-16378.
- Yamasaki, H., M. Hayashi, M. Fukazawa, Y. Kobayashi and T. Shikanai (2009).**"SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis." *Plant Cell* **21**(1): 347-361.
- Zhou, C., Y. Yang and A. Y. Jong (1990).**"Mini-prep in ten minutes." *Biotechniques* **8**(2): 172-173.

VIII. ANHANG

Tabelle A1: Alle potentiellen PIC1-Interaktionspartner

Liste der potentiellen PIC1 Interaktionspartner in *Arabidopsis* sortiert nach ihrer Listennummer (Nr.). Der zugehörige AGI-Code, eine Beschreibung/Name und die mögliche Funktion sowie Lokalisation sind angegeben. ?: unbekannte Lokalisation

Nr.	AGI-Code	Funktion/Beschreibung	Lokalisation
1	At2g36380	möglicher ABC-Transporter (AtABCG34/AtPDR6))	Mitochondrium
2	At1g69910	mögliche Rezeptor-ähnliche Proteinkinase	sekretorischer Weg
3	At3g11773	ähnlich zu Glutaredoxin-Familie-Protein	Mito./sek. Weg
4	AT1G13560	AAPT1, Aminoalkoholphosphotransferase	sekretorischer Weg
5	At1g66760	MATE-Protein DTX9	?
6	At1g53210	möglicher Natrium:Calcium-Kationenaustauscher	sekretorischer Weg
7	At1g08920	mögliches Zucker-Transport-Protein (ERD6)	sekretorischer Weg
8	AT4g17340	AtTIP2.2 (engl.: "tonoplast intrinsic protein 2")	sekretorischer Weg
9	AT5g45420	myb-Familie Transkriptionsfaktor	?
10	At1g44920	hypothetisches Protein	Chloroplast
11	At1g52870	mögliches peroxisomales PMP22-Familie-Protein mit unbekannter Funktion	Chloroplast
12	AT5g13180	NAC-Familie Transkriptionsfaktor (AtANAC083)	?
13	AT3g26520	AtTIP1.2 (engl.: "tonoplast intrinsic protein 1")	sekretorischer Weg
14	AT3g13120	30S-ribosomales Protein S10	Chloroplast
15	At5g45420	myb-Familie Transkriptionsfaktor	sekretorischer Weg
16	At4g30580	mögliche Lysophosphatidsäure Acyltransferase	Chloroplast
17	At1g43130	LCV2 (engl.: "like continuous vascular ring 2")	?
18	At2g36380	PDR6, ABC-Transporter	Mitochondrium
19	At5g42000	ORMDL Protein	sekretorischer Weg
20	At5g37310	endomembranes Protein mit unbekannter Funktion	sekretorischer Weg
21	At3g59500	integrales Membranprotein (HRF1)	Chloroplast

Nr.	AGI-Code	Funktion/Beschreibung	Lokalisation
22	At3g12100	AtMTPc2, mögliches CDF-Protein (engl.: "cation diffusion facilitator")	?
23	At2g36100	integrales Membranprotein mit unbekannter Funktion	?
24	At3g13060	YT521-B-ähnliches Protein (AtECT5)	Chloroplast/Mitochondrium
25	At3g61430	AtPIP1.1 (engl.: "plasma membrane intrinsic protein 1a")	?
30	At4g12650	AtEMP7/AtTMN12, unbekannte Funktion	sekretorischer Weg
31	At4g19980	hypothetisches Protein	Chloroplast
32	At4g31510	hypothetisches Protein	Chloroplast
33	AtCg00020	D1, Chlorophyll bindendes Protein, Photosystem II	Chloroplast
34	At2g37450	Membranprotein mit unbekannter Funktion	sekretorischer Weg
35	At4g21790	AtTOM1	sekretorischer Weg
36	AT4g23630	AtRTNLB1, unbekannte Funktion	?
37	At1g22750	Membranprotein mit unbekannter Funktion	sekretorischer Weg
38	At1g14670	endomembranes Protein mit unbekannter Funktion	sekretorischer Weg
39	At5g44020	Phosphatase	sekretorischer Weg
40	AT5g41600	AtRTNLB4, unbekannte Funktion	?
41	At1g20620	Katalase 3 (SEN2)	sek. Weg/Chloroplast
42	AT3g61430	AtPIP1.1 (engl.: "plasma membrane intrinsic protein 1a")	sekretorischer Weg
43	AT4g20870	mögliche Fettsäure-Hydroxylase	sekretorischer Weg
44	At4g12800	Untereinheit PsaL des Photosystems I	Chloroplast
45	At4g35100	mögliches Plasmamembran Protein 3a (AtPIP2.7)	sekretorischer Weg
46	At5g10480	mögliche Antiphosphatase (AtPEP/AtPAS2)	Mito./sek. Weg
47	At1g25230	PAP-Typ Phosphatase (AtPAP4)	sekretorischer Weg
48	At1g57610	Membranprotein mit unbekannter Funktion	Mitochondrium
49	At3g48740	Sucrose Exporter (AtSWEET11)	sekretorischer Weg
50	At1g04340	Lesionen induzierendes Protein	sekretorischer Weg
51	At4g02600	AtMLO1: Membranprotein, Funktion in der Zelltot-Kontrolle	sekretorischer Weg
52	At5g47560	AtDT (engl.: "tonoplast dicarboxylate transporter")	sekretorischer Weg
53	At3g56310	alpha-Galactosidase	sekretorischer Weg
54	At1g20980	mögliches Squamosa-Promoter bindendes Protein	Mito./sek. Weg

Nr.	AGI-Code	Funktion/Beschreibung	Lokalisation
55	AT3g16370	mögliches APG-Protein	sekretorischer Weg
56	At1g27450	Adenin Phosphoribosyltransferase (AtAPT1/AtAPRT)	Chloroplast/Mitochondrium
57	At2g25610	vakuoläre V0-ATPase-Untereinheit (AtVHA-c-prime-prime2)	Chloroplast/sek. Weg
58	AT4g27720	möglicher Transporter	sekretorischer Weg
59	At4g27540	möglicher Rab-Familie GTPase-Rezeptor (AtPRA1.H)	Chloroplast
60	At2g46800	CDF-Protein, vakuolärer Zink:Protonen Antiporter (AtMTP1/AtZAT1)	?
61	AT2G16510	vakuoläre V0-ATPase Untereinheit (AtVHA-c5/AtAVA-P5)	sekretorischer Weg
62	At2g22670	IAA8, Auxin-Antwort	?
63	AT4g35080	hochaffiner Nickeltransporter	Chloroplast
64	At5g21430	DnaJ-Domäne-Familie, unbekannte Funktion	Chloroplast
65	At1g21900	emp24/gp25L/p24-Familie, unbekannte Funktion	sekretorischer Weg
66	At1g14670	endomembranes Protein mit unbekannter Funktion	sekretorischer Weg
67	At5g47120	Bax-Inhibitor ähnliches Protein (AtBI-1), unterdrückt Zelltot	Chloroplast/sek. Weg
68	AT3g19930	Monosaccharid-Protonen-Symporter (AtSTP4)	sekretorischer Weg
69	At2g02040	Oligopeptide- und Histidin-Transporter (AtPTR2-B/AtOPT1-1/AtNTR1)	sekretorischer Weg
70	AT4g32530	vakuoläre V0-ATPase-Untereinheit (AtVHA-c-prime-prime1)	sekretorischer Weg
71	At1g75500	Membranprotein mit unbekannter Funktion	Mito./sek. Weg
72	At1g22710	Sucrose-Protonen-Symporter (AtSUC2)	sekretorischer Weg
73	At1g69850	niedrigaffiner Nitrat-Transporter (AtNRT1.2/AtNLT1)	sekretorischer Weg
74	At4g30190	möglicher Plasmamembranen Protonentransporter (AtAHA2)	?
75	At3g48740	Sucrose Exporter (AtSWEET11)	sekretorischer Weg
76	At2g24150	Membranprotein mit unbekannter Funktion (AtHHP3)	Mitochondrium
77	At5g38660	involviert in Anpassung der Photosynthese an Licht (AtAPE1)	Chloroplast
78	At5g46110	Triosephosphat/Phosphat Translokator (AtTPT)	Chloroplast/Mitochondrium
79	At5g62880	AtROP11/AtRAC10	sekretorischer Weg
80	At4g32410	katalytische Untereinheit der Zellulose-Synthase (AtCesA1/AtRSW1)	?
81	At4g25280	Adenylat-Kinase-Protein	Chloroplast/Mito./sek. Weg
82	At5g47450	AtTIP2.3 (engl.: "tonoplast intrinsic protein 3")	sekretorischer Weg
83	At3g21690	möglicher MATE-Transporter (AtDTX40)	Chloroplast

Nr.	AGI-Code	Funktion/Beschreibung	Lokalisation
84	At1g70770	hypothetisches Protein	Chloroplast
85	At3g06180	mögliches L34-Protein der großen, ribosomalen Untereinheit	Chloroplast/sek. Weg
86	At3g06170	Serin-Synthese-Protein	Chloroplast/sek. Weg
87	At3g26520	AtPIP1.1 (engl.: "plasma membrane intrinsic protein 1b")	sekretorischer Weg
88	At1g07670	möglicher Calcium-Transporter (AtECA4)	sekretorischer Weg
89	AtCg00140	CF0-ATP-Synthase Untereinheit (AtATP-III/AtATP-H)	Chloroplast
90	AtCg00130	CF0-ATP-Synthase Untereinheit (AtATP-I/AtATP-F)	Chloroplast
91	At1g12110	Nitrat-Transporter (AtNRT1.1/AtCHL1)	?
92	At3g12120	AtFAD2 (engl.: "omega-6 fatty acid desaturase")	Chloroplast
93	At5g46860	Vesikelltransport, Syntaxin-Familie (AtSYP22/AtSGR3/AtVAM3))	sekretorischer Weg
97	At2g37170	AtPIP2.2 (engl.: "plasma membrane intrinsic protein 2b")	sekretorischer Weg
95	At1g07810	Calcium/Mangan-Transporter (AtECA1/AtACA3)	sekretorischer Weg
96	At1g22750	mögliches Membranprotein mit unbekannter Funktion	sekretorischer Weg
97	At1g20840	Monosaccharid-Transporter (AtAZT1/AtTMT1))	sekretorischer Weg

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen:

- **Duy, D., Stübe R., G. Wanner and K. Philippar (2011).**"The Chloroplast Permease PIC1 Regulates Plant Growth and Development by Directing Homeostasis and Transport of Iron." *Plant Physiology* **155**(4): 1709-1722.
- **Stübe R., K. Philippar (in Vorbereitung).**"PIC1/NiCo/YGGT - metalltranslocon in the inner envelope of chloroplasts"

Poster:

- **Roland Stübe, Daniela Duy, Jürgen Soll und Katrin Philippar:** "PIC1, an iron permease in chloroplasts". Tagung: "Mineral nutrition in photosynthetic organisms", Maratea, Italien (2009)
- **Roland Stübe, Daniela Duy und Katrin Philippar:** "The iron permease PIC1 & its proteinaceous friends". Tagung: "15th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants ", Budapest, Ungarn (2010)
- **Roland Stübe, Corinna Hofer und Katrin Philippar:** "The iron permease PIC1 & its friend NiCo". Botanikertagung, Berlin, Deutschland (2011)
- **Roland Stübe, Katharina Bunk und Katrin Philippar:** "NiCo, a friend of the iron permease PIC1". Tagung: "16th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants ", Budapest, Ungarn (2012)

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Soll bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Auch wenn ich in der Anfangszeit des Öfteren mal "der Holger" war, was mir die Ehre einbrachte, dass mich Philipp heute immer noch bei jeder Gelegenheit "Holger" nennt, stand mir bei allen Problemen und Anliegen seine Tür immer offen. Vielen Dank für alles, Chef!

Dann natürlich ein riesengroßes Dankeschön an meine Betreuerin PD Dr. Katrin Philippar für die unermüdliche Hilfe und Unterstützung. Ob für den Laboralltag, für Besprechungen, für die Korrektur von Anschreiben, Postern und natürlich für die Korrektur dieser Arbeit: Du hast immer viele Stunden geopfert, sehr gute Ideen beigesteuert und alles letztendlich erst möglich gemacht! Auch die vielen schönen Abende, an denen Du deine Arbeitsgruppe eingeladen oder begleitet hast, haben mir eine Menge Spaß gemacht! Da ich gar nicht alles aufzählen kann und bestimmt einiges vergesse, möchte ich Dir sagen: Vielen DANK für alles!

Dann möchte ich mich natürlich bei dem gesamten "Labor 003" bedanken. Bei Karl, der immer einen hilfreichen Trick bei Experimenten oder eine lustige Anekdote über das Laborleben auf Lager hatte und bei Annette für die super Zusammenarbeit im Labor, für die Kletterunternehmungen und natürlich auch für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit. Auch an Nannan vielen Dank! Auch wenn Du oft den Gesprächen auf Deutsch nicht folgen konntest, hast Du dich immer angeschlossen, ob im Labor oder Außerhalb! Daniela, Sabrina und Birgit, Euch auch vielen Dank, dass Ihr mir als "Laborfrischling" immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt! Ganz spezieller Dank natürlich an Ingrid! Neben all Deiner Hilfe und dem Spaß im Labor liegt mir Deine gewonnene Freundschaft sehr am Herzen!

Dann noch ein dickes Dankeschön an die ganze "AG Soll"! Ob Postdoc, TA oder Doktorand, vielen Dank für Eure Hilfe und Unterstützung bei all den kleinen und großen Problemen die einem im Laufe einer Doktorarbeit ereilen. Ich habe mich in der Arbeitsgruppe immer wohl gefühlt.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Allen voran meinen Eltern, die mich bei allem immer unterstützt haben und meiner Schwester für die ich wohl immer der "kleine" Bruder sein werde. Ob von der Schule bis zur Promotion oder im Privaten, ohne Eure Hilfe hätte das alles nicht geklappt. Einen ganz großen und lieben Dank auch an Simona. Du hast auch immer meine Entscheidungen bedingungslos unterstützt, mir geholfen und mich aufgemuntert, wenn ich es brauchte! Auf in die nächsten Abendteuer!